



ANA CAROLINA BAHY AYMONE

RESTRIÇÕES ONTOGENÉTICAS E FILOGENÉTICAS NA EVOLUÇÃO DA FORMA DA
CÁPSULA CEFÁLICA EM OITO ESPÉCIES DE HELICONÍNEOS
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia e Comportamento Animal

Orientador: Prof. Dr. Gilson R. P. Moreira

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro C. Estrela

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE

2009

RESTRIÇÕES ONTOGENÉTICAS E FILOGENÉTICAS NA EVOLUÇÃO DA FORMA DA
CÁPSULA CEFÁLICA EM OITO ESPÉCIES DE HELICONÍNEOS
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

ANA CAROLINA BAHÍ AYMONE

Aprovada em 24/03/2009

Profa. Dra. Vera Lúcia S. Valente Gaiésky (UFRGS)

Profa. Dra. Larissa Rosa de Oliveira (USP)

Prof. Dr. Luís Alexandre Campos (UFRGS)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Alometria e evolução da forma biológica	1
A interação Heliconiini-Passifloraceae	4
Filogenia de Heliconiini	5
Padrões de oviposição e comportamento alimentar em Heliconiini	8
Sociabilidade em Heliconiini	11
Cápsula cefálica e músculo adutor das mandíbulas	12
Objetivo	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
Larvas	15
Morfometria Geométrica	19
Análise filogenética	23
RESULTADOS	25
Análises ontogenéticas	25
Análises filogenéticas	51
DISCUSSÃO	83
Análises ontogenéticas	83
Análises filogenéticas	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE	108

... *"I see hardly any way of distinguishing between the effects, on the one hand, of a part being largely developed through natural selection and another and adjoining part being reduced by this same process..., and, on the other hand, the actual withdrawal of nutriment from one part owing to the excess of growth in another and adjoining part"*.

[Darwin, 1859. *On the origin of species*, p.147]

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Gilson Moreira pelo imenso aprendizado que me proporcionou durante esses anos e pela força, incentivo e apoio ao longo do desenvolvimento “ontogenético” desta dissertação.

Ao Prof. Pedro Estrela por ter me introduzido às técnicas de morfometria geométrica e ao ambiente “R”.

A ‘R Development Core Team’, pelo livre acesso e facilidade analítica e gráfica para se obter resultados através de matrizes brutas.

Ao Prof. Dr. Andrew Brower (Middle Tennessee State University, TN, USA), por ter fornecido as seqüências nucleotídicas de espécies de heliconíneos, analisados na filogenia molecular de Beltrán *et al.* (2007).

À doutoranda Gislene L. Gonçalves (PPG Genética-UFRGS), pela realização das análises filogenéticas, às quais foram imprescindíveis para a etapa conclusiva deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Olaf H.H. Mielke e à Prof^a. Dr^a. Mirna M. Casagrande pela acolhida e apoio laboratorial na UFPR, durante o período de coleta e criação de imaturos em Curitiba. Ao doutorando Eduardo Carneiro (PPG Entomologia-UFPR) e ao Dr. Jorge S.S. Bizarro, pelo auxílio nas coletas no Paraná e excelente experiência em campo.

A André Klein (PPG Genética-UFRGS), Augusto Ferrari (PPG Biologia Animal-UFRGS), Leonardo Ré Jorge e Lucas Kaminski (PPG Ecologia-UNICAMPI) pelas valiosas sugestões e discussões.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e pelos benefícios oferecidos aos estudantes de pós-graduação. Da mesma forma, aos

professores dessa Universidade que, de uma forma ou de outra, sempre me incentivaram a permanecer na pesquisa acadêmica, desde os tempos de graduação.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

À Prof^a. Carla Ozorio, pela excelente experiência didática que proporcionou durante a minha prática em Docência, na disciplina Zoologia de Campo. Da mesma forma, aos alunos que orientei: Bruna Missaggia, Caroline Teixeira, Cláudio Reis, Clarissa Bandeira, Daniel Zimmer, Joyce Baptista, Kauai Oliveira, Paula Martinelli da Rosa, Thayná Lima e Valentina Zaffaroni.

À querida colega e amiga Érica Jaqueline Giani, pela parceria nas coletas e criações, viagens e inesquecíveis “indiadas”.

Aos colegas do LMCI-UFRGS: Ábner Campos, Danessa Boligon, Darli Massardo, Denis da Silva, Denise Dall’Bosco, Kim Barão e Rodrigo Petry pelo coleguismo e apoio conjunto.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais - José Newton Aymone e Margot Bahi Aymone - e irmãos - Daniel e Marco, por tudo que representam!

A Nestor Sanders, pelas idéias “luminosas”, momentos de paz e tranquilidade, amizade e companheirismo.

RESUMO

As variações ontogenéticas e filogenéticas na forma da cápsula cefálica em oito espécies de heliconíneos neotropicais (Lepidoptera: Nymphalidae) foram analisadas através de métodos de morfometria geométrica. As configurações de marcos anatômicos foram analisadas após ser aplicado o método de sobreposição de Procrustes, que remove os efeitos de tamanho, translação e rotação. Os resíduos de sobreposição de Procrustes (correspondentes às variáveis de forma) foram, então, submetidos a análises de componentes principais, bem como a análises de deformações relativas, cuja interpretação gráfica se deu através da função *thin plate splines*. Para testar a significância das variações ontogenéticas e interespecíficas da forma, foram realizadas MANOVA's. As relações de proximidade fenotípica entre os instares de cada espécie, e entre as espécies para cada instar, foram avaliadas através de árvores de Neighbor-Joining construídas com base em distâncias de Mahalanobis. As matrizes das distâncias de Mahalanobis entre as espécies para o primeiro e quinto instares foram comparadas através de teste de Mantel com as suas distâncias genéticas. Estas foram estimadas com base nas seqüências nucleotídicas utilizadas na filogenia molecular de Beltrán *et al.* (2007). Os métodos de morfometria geométrica utilizados permitiram evidenciar que tanto em nível ontogenético quanto filogenético, todas as espécies de heliconíneos avaliadas sofrem variações na forma de suas cápsulas cefálicas, porém não correlacionadas com a filogenia reconhecida. Foi constatada a existência de uma relação não linear entre as distâncias morfométricas e filogenéticas da literatura. Assim, os resultados indicam a presença de processos evolutivos adicionais, guiados por restrições ontogenéticas e ecológicas agindo sobre a diferenciação da forma das cápsulas cefálicas em Heliconiini.

INTRODUÇÃO

A conexão entre ontogenia e evolução tem sido objeto de estudo há mais de um século, sendo Haeckel (1866) um dos pioneiros. Entretanto, permaneceu estagnada durante certo período, até S. J. Gould publicar o clássico *Ontogeny and Phylogeny*, em 1977. A partir de então, diversos autores têm buscado sintetizar a biologia evolutiva e a biologia do desenvolvimento em uma única teoria, conhecida como “*evo-devo*” (Atkinson 1992, Hall 1992, Gilbert *et al.* 1996, Raff 1996, Hall *et al.* 2003, Brakefield 2006).

Ontogenia, no seu conceito mais amplo, refere-se ao desenvolvimento de um organismo desde o zigoto até a morte, estando, por isso, estreitamente relacionada à evolução das histórias de vida (McKinney 1986, McKinney & McNamara 1991).

De um ponto de vista mais restrito, o conceito de ontogenia pode se referir ao desenvolvimento de cada parte ou estrutura corporal em um único indivíduo (Gould 1977, Alberch 1980, Zelditch *et al.* 2000, Webster & Zelditch 2005).

Dessa maneira, a evolução de ontogenias, ou padrões de desenvolvimento, aliados aos componentes de história de vida e à seleção natural, devem explicar grande parte da evolução morfológica e da diversidade cladística nos diferentes níveis taxonômicos (Alberch *et al.* 1979, Fink 1982, McKinney 1988, Zelditch *et al.* 1993, Fink & Zelditch 1995, Zelditch & Fink 1995, McNamara 1997, Klingenberg 1998, Beldade *et al.* 2002, Smith 2003, Nijhout 2008).

Alometria e evolução da forma biológica

As relações entre as mudanças de forma e tamanho são denominadas alometria (Gould 1966, 1977), a qual foi originalmente definida por Huxley (1950)

como as taxas diferenciais de crescimento entre diferentes medidas ou estruturas de um organismo (Gayon 2000).

Atualmente, a alometria tem sido subdividida em três diferentes tipos, que são 1) alometria ontogenética - considera as mudanças na magnitude de um organismo no decorrer do seu desenvolvimento, 2) alometria estática - relaciona ou compara a magnitude de estruturas ou órgãos entre indivíduos coespecíficos no mesmo estágio de desenvolvimento - e 3) alometria filogenética - compara os crescimentos relativos de diferentes espécies para análise de filogenias, bem como de processos causadores de especiação (Cheverud 1982, Klingenberg & Zimmermann 1992).

A alometria tem se revelado um interessante ponto de vista na compreensão de padrões ontogenéticos em relação à adaptação a fatores ecológicos e comportamentais (Sinervo & Huey 1990, McKinney & McNamara 1991, Emlen 1996, 1997, Hall *et al.* 2003, Frankino *et al.* 2007), uma vez que muitos padrões alométricos são adaptativos - objetos da seleção natural (Nijhout & Wheeler 1996, Nijhout & Emlen 1998, Stern & Emlen 1999, Frankino *et al.* 2005).

Wolf *et al.* (2001) propuseram modelos onde fatores genéticos, epigenéticos e epistáticos interagentes seriam determinantes das covariâncias ontogenéticas entre as características fenotípicas de um dado organismo. Assim, sugerem haver uma intermodularidade orgânico-sistêmica, a qual pode se dar através de um *feedback* acompanhado de um *trade-off* entre estruturas em desenvolvimento.

O estudo restrito da forma foi abordado biometricamente por D'Arcy Wentworth Thompson, através de sua clássica obra, *On Growth and Form*, de 1917. Segundo esta, a modificação da forma biológica ao longo da evolução dos grupos envolve a ação de fenômenos físicos, sendo passível, portanto, de descrição em

termos de leis matemáticas. Em especial, o uso de coordenadas cartesianas para analisar mudanças na forma animal - o que integra a sua conhecida 'Teoria das Transformações'.

Hoje, o estudo analítico da forma encontra-se em crescente expansão, sobretudo devido aos avanços técnicos e conceituais da morfometria geométrica (Bookstein 1991, 1996, Monteiro & Reis 1999, Roth & Mercer 2000, Zelditch *et al.* 1995, Zelditch *et al.* 1998, Zelditch *et al.* 2004).

Dentro deste enfoque, a forma passou a ser conceituada como todas as propriedades de uma configuração de pontos que não se alteram por efeitos de tamanho, posição e orientação (Kendall 1977).

A morfometria geométrica tem sido amplamente utilizada em estudos referentes, por exemplo, a estabelecimentos quanto à filogenia de espécies estritamente aparentadas (Rohlf 1998, Monteiro & Abe 1999), detecção de processos heterocrônicos (Klingenberg & Spence 1993, Vinicius & Lahr 2003), caracterização de dimorfismo sexual (Adams & Funk 1997) e compreensão da trajetória ontogenética de estruturas morfológicas no decorrer do desenvolvimento de um dado organismo (Rodrigues *et al.* 2005, Rodrigues & Moreira 2005), dentre outras aplicações.

Diversos fatores biológicos causam alterações na forma entre indivíduos, tais como o desenvolvimento ontogenético e a diversificação evolutiva. Diferenças na forma podem ser devidas a diferentes respostas às mesmas pressões seletivas (ou diferenças nas próprias pressões seletivas), bem como diferenças nos padrões de crescimento e morfogênese. A análise da forma é uma abordagem para compreender essas diversas causas da variação e transformação morfológica (Zelditch *et al.* 2001, Zelditch *et al.* 2004).

Traços fenotípicos complexos são construídos durante o desenvolvimento por um intrincado arranjo de fatores e interações entre fatores, incluindo DNA, RNA, proteínas, módulos desenvolvimentais e diversos fatores ambientais (Atchley 1991, Wolf 2002, Rice 2004). Como resultado, é o desenvolvimento que estrutura a relação entre o genótipo e o fenótipo, desse modo, determina a arquitetura genética (Wu & Hou 2006).

Em nível morfológico, as primeiras características alvo da seleção natural, e que refletem diretamente a adaptabilidade de um organismo a um dado meio, são o tamanho e a forma. Assim, grande parte da evolução morfológica pode ser descrita através de alterações na forma e/ou tamanho de um ou mais traços individuais de um organismo (Klingenberg 1998, Zelditch *et al.* 2000, Webster & Zelditch 2005).

A evolução morfológica dos insetos herbívoros se encontra diretamente relacionada às pressões seletivas impostas pelas plantas hospedeiras, através de barreiras físicas e químicas (Bernays 1991, Futuyma 2000). Bernays (1991), em razão disso, alerta que a morfologia deve ser analisada conjuntamente com a ecologia e o comportamento, devido à direta interação entre esses três fatores, principalmente em relação às plantas hospedeiras, cujos padrões morfo-ecológicos são altamente variáveis.

A interação Heliconiini-Passifloraceae

Os heliconíneos (Lepidoptera, Nymphalidae), ou borboletas-do-maracujá, são um dos mais conhecidos grupos de borboletas (Beltrán *et al.* 2007). Devido à coloração aposemática dos adultos, participação em anéis miméticos e variabilidade geográfica, têm sido objeto de estudos taxonômicos há mais de um século (Stichel 1906, Michener

1942, Emsley 1963, Brown & Mielke 1972, Turner 1976, Brown 1981, Brower 1994, Brower & Egan 1997, Penz 1999, Beltrán *et al.* 2007).

Atualmente, Heliconiini possui cerca de 70 espécies (Brown 1981), distribuídas em 10 gêneros, que são: *Agraulis* Boisduval & Le Conte, *Dione* Hübner, *Dryadula* Michener, *Dryas* Hübner, *Eueides* Hübner, *Heliconius* Kluk, *Laparus* Billberg, *Neruda* Turner, *Philaethria* Billberg e *Podotricha* Michener.

Principalmente aquelas do gênero *Heliconius* têm sido consideradas modelos de estudo em ecologia comportamental e evolução (Gilbert 1991), em parte devido a sua fácil adaptação às condições de insetário e laboratório (criação de imaturos), bem como ao fácil cultivo de suas plantas hospedeiras - os maracujás (Passifloraceae).

A família Passifloraceae é representada por 600 espécies, distribuídas em 12 gêneros. No Brasil, ocorrem os gêneros *Mitostemma*, *Dilkea*, *Tetrastylis* e *Passiflora*. O gênero *Passiflora* abrange o maior número de espécies - aproximadamente 400, distribuídas em 22 subgêneros (Sacco 1980).

Tanto os heliconíneos como as passifloráceas encontram-se amplamente distribuídos na região Neotropical (Benson *et al.* 1976). No contexto da interação inseto-plantas, têm fornecido um amplo aporte de conhecimento a respeito da coevolução entre insetos e plantas hospedeiras (Gilbert 1975, 1991, Benson *et al.* 1976, Brower 1997, Futuyma 2000).

Filogenia de Heliconiini

Além de sua reconhecida importância para estudos de cunho evolutivo e ecológico, atualmente é um dos grupos de insetos mais trabalhados do ponto de vista filogenético. As maiores contribuições ao estudo sistemático-filogenético dos

heliconíneos, até o presente momento, foram Michener (1942), Emsley (1963), Brown (1981), Lee *et al.* (1992), Brower (1994), Brower & Egan (1997), Penz (1999) e Beltrán *et al.* (2007). Destes, apenas os quatro últimos valeram-se de métodos cladísticos e da utilização de dados moleculares.

Michener (1942), através de uma revisão genérica, com base na morfologia dos adultos, propôs diagnoses e uma chave de identificação para sete gêneros de Heliconiini, sendo o marco divisório para a sistemática desse grupo.

Emsley (1963) foi o primeiro a propor uma filogenia para as borboletas-do-maracujá. Através de caracteres morfológicos dos adultos - com ênfase na distribuição das escamas androconiais, estabeleceu um nível basal a partir do qual todas as espécies divergiram. A cladogênese do gênero *Philaethria*, nesta análise, foi considerada a mais antiga, ou seja, foi o primeiro gênero a divergir.

Brown (1981) baseou-se na filogenia de Emsley (1963) para substanciar as relações filogenéticas entre os heliconíneos. Desse modo, adicionou (indiretamente) em sua análise caracteres tais como morfologia da pupa (Turner 1968), comportamento do adulto (Gilbert 1975), bioquímica (Brown 1967) e genética (Suomaleinen *et al.* 1971), para suplementar e refinar a filogenia proposta por Emsley (1963).

Lee *et al.* (1992) analisaram as relações filogenéticas entre dez espécies de heliconíneos, com base na morfologia e em sítios de restrição de genes transcritores de RNA ribossomal. A análise combinada de ambos os dados resultou em uma árvore filogenética similar aos trabalhos anteriores.

Brower (1994) utilizou dados seqüenciais de DNA mitocondrial e métodos cladísticos para analisar a filogenia de Heliconiini. Embora o enfoque de seu trabalho

tenha sido dado aos gêneros *Eueides*, *Neruda*, *Laparus* e *Heliconius*, incluiu nove gêneros de heliconíneos, excluindo somente o gênero *Agraulis*. Nesta proposta, o gênero *Heliconius* foi parafilético com relação a *Eueides*, *Neruda* e *Laparus*.

Brower & Egan (1997) revisaram a filogenia de Brower (1994) usando a combinação de seqüências de DNA mitocondrial e do gene nuclear *wingless*. Além disso, foram incluídos na análise o gênero *Agraulis* e uma espécie (não heliconíneo) representativa de um grupo externo. Conforme a análise combinada de ambas as seqüências, o gênero *Eueides* formou uma linhagem ancestral em relação ao gênero *Heliconius*, que permaneceu parafilético com relação a *Neruda* e *Laparus* - um resultado diferente do obtido por Brower (1994), em que a posição de *Eueides* está estreitamente relacionada a uma linhagem derivada de *Heliconius*.

Penz (1999) analisou as relações filogenéticas entre 24 espécies de heliconíneos, representativas dos 10 gêneros, com base em caracteres morfológicos dos estágios imaturos (incluindo a morfologia do ovo, do primeiro e do quinto instar larval e da pupa) e dos adultos. Conforme sua análise, o gênero *Heliconius* assumiu uma condição monofilética, com os gêneros *Eueides*, *Neruda* e *Laparus* integrando um único clado, basal em relação ao gênero *Heliconius*. Esta foi a primeira análise filogenética a utilizar formalmente os estágios imaturos. A supracitada autora ainda ressalta a importância destes para a compreensão filogenética de Heliconiinae.

Finalmente, Beltrán *et al.* (2007) reavaliaram as relações filogenéticas de 60 espécies de Heliconinae, através de genes mitocondriais (Citocromo Oxidase e 16S) e nucleares (*Elongation factor-1 α* , *apterous*, *decapentaplegic* e *wingless*). Os autores valeram-se da árvore obtida para discutir a evolução de três características ecológicas - alimentação de pólen, cruzamento pupal e gregriedade larval.

Em todas as filogenias citadas, os gêneros *Agraulis*, *Dione*, *Philaethria*, *Podotricha*, *Dryas* e *Dryadula* (não necessariamente nesta ordem) sempre foram os primeiros a divergir e independentes de *Heliconius*, *Eueides*, *Neruda* e *Laparus*.

Padrões de oviposição e comportamento alimentar em Heliconiini

Os ovos de Heliconiini podem ser encontrados nas mais diversas partes da planta, como brotos, gavinhas verdes ou secas, superfície adaxial ou abaxial de folhas jovens ou velhas, ou mesmo fora da planta (Dell'Erba *et al.* 2005).

De um modo geral, os gêneros mais ancestrais (*Agraulis*, *Dione*, *Philaethria*, *Podotricha*, *Dryas* e *Dryadula*) ou ovipositam indiscriminadamente em qualquer parte da planta, aparentemente sem exibir uma preferência específica por tecidos jovens ou velhos, ou o fazem especificamente em tecidos velhos - folhas duras e gavinhas secas. O mesmo não ocorre para os gêneros derivados (*Heliconius*, *Laparus*, *Neruda* e *Eueides*), cujos ovos são freqüentemente depositados sobre tecidos jovens - meristemas apicais, folhas jovens e gavinhas verdes (Brown 1981).

Em geral as larvas de primeiro instar exibem uma locomoção relativamente de curto alcance, conseqüentemente alimentam-se de regiões próximas ao local onde foi realizada a oviposição, o qual, então, está intimamente associado ao comportamento alimentar das larvas (Alexander 1961).

As espécies de *Passiflora* apresentam diferentes graus de rigidez foliar, tanto em nível interespecífico quanto intra-específico. Neste nível, o grau de rigidez pode se dar em função da idade da folha, uma vez que a ontogênese da mesma implica em maior deposição de celulose, hemicelulose, pectina e outros consolidantes da parede celular, o que resulta em maior rigidez e dureza da estrutura foliar.

Alexander (1961), ao comparar as diferentes eficiências dos heliconíneos ao lidar com a ingestão de tecidos duros, propôs que este fato poderia estar associado a diferenças na forma das mandíbulas. Por exemplo, no caso das larvas de *Eueides isabella* e *Heliconius melpomene*, ambas alimentando-se em *Passiflora laurifolia*, diferem em relação aos tecidos foliares ingeridos. Enquanto *E. isabella* ingere apenas o parênquima, deixando a nervura central intacta, *H. melpomene* ingere tanto o parênquima quanto a nervura central, sugerindo que as mandíbulas dessa espécie seriam mais eficientes com relação às de *E. isabella*. Ao comparar a morfologia das mandíbulas entre essas duas espécies, constata-se que a região incisora (responsável por cortar o alimento) de *H. melpomene* é muito mais desenvolvida, o mesmo valendo para a região molar (responsável pela trituração).

Outras espécies, tais como *Dryas iulia* e *Heliconius erato*, que costumam ingerir o parênquima e a nervura central e, adicionalmente, durante a passagem para outra folha, podem também ingerir o pecíolo; e *H. erato*, além do pecíolo, o caule. Ambas as espécies possuem mandíbulas com as regiões incisora e molar bem desenvolvidas.

Périco & Araújo (1991) e Périco (1995) analisaram as relações entre quatro espécies de heliconíneos (*Agraulis vanillae maculosa*, *Dryas iulia*, *Heliconius erato phyllis* e *Heliconius ethilla narcaea*) e suas passifloráceas hospedeiras. Avaliaram também o uso destas para a oviposição das fêmeas e a forma de partição de recursos pelas larvas. *Passiflora suberosa* foi a espécie que recebeu maior quantidade de ovos, entretanto, não foi nela encontrado ovos de *H. ethilla*. A partição de recursos pode ocorrer pela utilização de partes diferentes da planta ou pela utilização de habitats diferentes. *D. iulia* e *H. erato* ovipositam praticamente nas mesmas espécies de plantas, porém a primeira prefere ovipositar em gavinhas mais velhas, enquanto a

outra, assim como *H. ethilla*, utiliza preferencialmente folhas jovens, brotos ou gavinhas (constatado também por Borges 2005). Em se tratando de *Agraulis vanillae*, não há um padrão específico de preferência. Foram também avaliados o tempo e a taxa de crescimento das quatro espécies de heliconíneos criadas em nove espécies de *Passiflora*, as quais apresentaram performance diferenciada para cada passiflorácea, permitindo corroborar que existe uma especificidade na escolha das fêmeas para oviposição, em vista da performance larval em diferentes plantas.

Rodrigues & Moreira (1999) testaram o efeito da idade da folha de *Passiflora suberosa* no desenvolvimento e na performance larval de *H. erato*, sendo constatado que as larvas de primeiro ínstar não conseguem fazer uso de tecidos maduros (folhas rígidas), havendo neste caso alta mortalidade. As poucas larvas sobreviventes fizeram uso de folhas maduras somente através de raspagem dos tecidos.

Silveira (2002) avaliou o mesmo efeito, porém na integridade das mandíbulas de *H. erato phyllis*. Constatou que diante de folhas duras, as mandíbulas se desgastam, podendo haver, inclusive, perda de dentes.

O padrão de consumo das larvas de *H. erato*, portanto, inicia na região apical do ramo - onde as folhas ainda são tenras, e avança em direção à base, havendo preferência e dependência das larvas nos instares iniciais por tecidos jovens; ao passo que nos instares finais, há preferência por tecidos maduros (Rodrigues & Moreira 1999).

Rodrigues & Moreira (2002) avaliaram o efeito da variação geográfica de duas passifloráceas utilizadas pelas larvas de *Heliconius erato* sobre o tamanho dos adultos correspondentes. Demonstraram que os adultos provindos de larvas alimentadas sobre *P. misera* são relativamente maiores que os provindos de larvas alimentadas

sobre *P. suberosa*. A herdabilidade estimada para o tamanho foi nula, indicando que a variação no tamanho dos adultos não se dá por influência genética, na amplitude de variação de tamanho verificada em campo.

Rodrigues & Moreira (2004) analisaram a variação no tamanho dos adultos de *H. erato* em função da variação sazonal na abundância de *P. misera* (sua espécie preferida para oviposição) em relação a *P. suberosa*. Esta passiflorácea mantém-se perene durante todo o ano, já *P. misera* é completamente desfolhada nos meses de outono e inverno. Nesses meses, os adultos de *H. erato* passam a ovipositar alternativamente em *P. suberosa*, sendo os adultos gerados relativamente menores que os gerados nos meses de primavera e verão. O efeito estimado da temperatura foi nulo. Desse modo, as variações sazonais, assim como as geográficas (Rodrigues & Moreira 2002), no tamanho dos adultos de *H. erato* são primariamente influenciadas pela qualidade e disponibilidade das hospedeiras utilizadas pelas larvas.

Sociabilidade em Heliconiini

Além das diferenças nos padrões de consumo, as larvas de Heliconiini podem ainda ser classificadas em relação ao grau de sociabilidade, podendo ser solitárias, semi-gregárias ou gregárias (Brown 1981). Assim, os ovos podem ser dispostos isoladamente, em pequenos grupos, ou na forma de *clusters* típicos, que podem variar de 10 (quantidade mínima para uma espécie ser classificada como gregária) a 200 ovos (Brown 1981).

Em Heliconiini, o hábito gregário ocorre em aproximadamente 50% das espécies e está presente nos gêneros *Dione*, *Eueides*, *Heliconius*, *Laparus* e *Neruda*.

Segundo Beltrán *et al.* (2007), este hábito evoluiu pelo menos três vezes, independentemente.

Bianchi & Moreira (2005) avaliaram o efeito da densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* - subespécie de comportamento gregário. Observaram que a taxa de sobrevivência foi significativamente reduzida nos grupos com baixa densidade larval, e que tal comportamento pode estar associado, portanto, à facilitação alimentar.

Cápsula cefálica e músculo adutor das mandíbulas

A cápsula cefálica de Lepidoptera é uma estrutura esclerotizada que, a cada troca de instar, separa-se da epiderme, num processo denominado apólise (Heming 2003), concomitante ao processo de formação de uma nova cápsula cefálica.

Internamente, o volume dessa estrutura é em grande parte preenchido pelo músculo adutor das mandíbulas (Snodgrass 1935, Gronenberg *et al.* 1997, Vegliante 2005), o qual é responsável pelo movimento de fechar as mesmas. Esse músculo origina-se principalmente na porção superior da cápsula cefálica e insere-se em um apódema conectado diretamente à base de cada mandíbula (Chapman 1998).

As mandíbulas, por sua vez, são responsáveis pela função primária de cortar o alimento em fragmentos menores para que esses possam ser ingeridos e transferidos ao intestino anterior (Chapman 1998). Esta função aparentemente simples envolve uma série de fatores mecânicos, neuronais e químicos que, integrados, determinarão a performance do inseto frente à ingestão de seu alimento.

Morfologicamente, cada mandíbula consiste de uma região incisora, onde se situam os dentes responsáveis por cortar o alimento, e uma região molar, responsável

por moer, triturar e macerar. Cada dente da região incisora é innervado por inúmeros receptores sensoriais, os quais detectam a dureza do alimento e modulam a força e a velocidade necessárias a serem aplicadas pelo músculo adutor (Scoble 1992, Gronenberg *et al.* 1997). O padrão de innervação do músculo adutor tem sido estudado em himenópteros (Masuko 1986, Rehder 1989, Paul & Gronenberg 2002), em ortópteros (Baines *et al.* 1990) e nas larvas da mariposa *Manduca sexta* (Griss 1990).

O significado comportamental do músculo adutor é refletido por seu *design* anatômico. É constituído por dois tipos de fibras musculares, as quais são compostas por sarcômeros curtos (2-3 μm) ou longos (5-6 μm). Sarcômeros curtos estão associados à rapidez da contração, enquanto os longos estão associados à força – e desempenham movimentos não muito rápidos (Müller *et al.* 1992).

Já foi constatado que o músculo adutor determina diretamente a forma e o tamanho da região cefálica em insetos mastigadores (Das 1937, Snodgrass 1935, Matsuda 1965). Por estar diretamente envolvido com os requerimentos biomecânicos da mastigação, alguns trabalhos têm buscado relacionar a forma e/ou o tamanho da região cefálica (como reflexo do crescimento do músculo adutor) com os diversos hábitos alimentares apresentados pelos insetos mastigadores (Bernays 1986, Bernays & Hamai 1987, Wheeler & Evans 1989, Gronenberg *et al.* 1997, Gorb & Beutel 2000, Brannen *et al.* 2005).

A morfometria geométrica tem sido extensamente aplicada em trabalhos com fundo evolutivo, buscando relacionar forma à função e/ou a fatores relacionados à ecologia dos organismos estudados. Trabalhos com esse viés têm sido realizados, sobretudo, com vertebrados (Monteiro & Abe 1999, Bruner & Manzi 2001, León & Zollikofer 2001, Cardini 2003, Kawakami & Yamamura 2008). Desconhecemos, porém,

a existência de trabalhos que tenham se valido da utilização da morfometria geométrica para abordar as relações existentes entre os mecanismos de ingestão de insetos herbívoros e suas plantas hospedeiras.

Objetivo

Com base no estudo ontogenético da variação na forma da cápsula cefálica de espécies representativas das diferentes linhagens (utilizando-se como referência a filogenia de Beltrán *et al.* 2007) e hábitos alimentares dos heliconíneos, através de métodos de morfometria geométrica, esta dissertação teve como objetivo responder à seguinte questão:

- As larvas de Heliconiini de diferentes gêneros, padrões alimentares e graus de sociabilidade distintos, apresentam variação ontogenética e/ou filogenética na forma de suas cápsulas cefálicas?

MATERIAL E MÉTODOS

Larvas

O estudo foi desenvolvido com o estágio larval das seguintes espécies: *Agraulis vanillae* (Linnaeus, 1758), *Dione juno* (Cramer, 1779), *Philaethria wernickei* (Röber, 1906), *Dryas iulia* (Fabricius, 1775), *Eueides aliphera* (Godart, 1819), *Heliconius sara* (Fabricius, 1793), *Heliconius erato* (Linnaeus, 1758) e *Heliconius ethilla* Godart, 1819. A escolha se deu em função da disponibilidade geográfica na região Sul do Brasil. A Tabela 1 lista os locais de coleta dos espécimes, as plantas hospedeiras utilizadas e o hábito alimentar das larvas.

As larvas foram obtidas de ovos coletados em campo ou provindos de adultos criados em insetário existente no Departamento de Zoologia - Campus Vale, UFRGS, Porto Alegre, o qual consiste de um telado de arame de 10m de comprimento x 5 de largura x 2,7 de altura, revestido com tela de sombrite 50% de cor preta, e dividido em 10 compartimentos (unidades de 2m x 2m).

As borboletas criadas em insetário (*D. iulia*, *H. erato* e *H. ethilla*) foram mantidas juntamente com ramos das respectivas hospedeiras, dispostos em garrafas plásticas com água e providas de uma armação de arame e madeira, para auxílio à orientação dos ramos (Ferro 1998).

Diariamente, no horário de maior atividade das borboletas (entre 10 e 14h), o insetário era monitorado para renovação do complemento alimentar (solução de pólen, mel e água destilada, seguindo a proporção 2:1:7, disposta em recipientes plásticos -descrito em detalhes em Ferro 1998), coleta de ovos e reposição dos ramos, quando necessário.

Em laboratório, os ovos (acondicionados em placas de Petri com papel filtro umedecido) foram mantidos em câmara climatizada sob condições abióticas controladas ($25\pm 1^\circ\text{C}$; fotofase 14h/luz/dia). Após a eclosão, as larvas foram transferidas, individualmente ou em grupo - no caso das espécies gregárias - para os ramos das respectivas hospedeiras (Tab.1).

Os ramos com larvas eram cobertos com tela de náilon, vistoriados diariamente e trocados quando necessário, de maneira que sempre houvesse alimento disponível.

As larvas foram criadas separadamente até completar-se o instar desejado (L1-L5). As larvas então foram fixadas em fluido de Dietrich e preservadas em álcool 70%. A Tabela 2 lista o número de indivíduos utilizados por espécie/instar.

Tabela 1. Espécies do estudo e respectivos acrônimos utilizados nas análises morfométricas, locais de coleta, plantas hospedeiras e hábitos alimentar e social.

Espécie	Acrônimo	Local de coleta	<i>Passiflora</i> sp. utilizada*	Hábito alimentar e social**
<i>Agraulis vanillae</i>	AVM	Porto Alegre, RS	<i>P. caerulea</i>	Generalista, solitária
<i>Dione juno</i>	DJJ	Porto Alegre, RS	<i>P. edulis</i>	Folhas velhas, gregária
<i>Philaethria wernickei</i>	PW	Curitiba, PR	<i>P. actinia</i>	Folhas velhas, solitária
<i>Dryas iulia</i>	DIA	Porto Alegre, RS	<i>P. suberosa</i>	Folhas velhas, solitária
<i>Eueides aliphera</i>	EAA	Curitiba, PR	<i>P. actinia</i>	Folhas jovens, solitária
<i>Heliconius sara</i>	HSA	Morro do Baú, SC	<i>P. truncata</i>	Folhas jovens, gregária
<i>Heliconius erato</i>	HEP	Porto Alegre, RS	<i>P. misera</i>	Folhas jovens, solitária
<i>Heliconius ethilla</i>	HEN	Porto Alegre, RS	<i>P. alata</i>	Folhas jovens, solitária

*conforme registro de Dell'Erba *et al.* (2005); ** conforme Brown (1981).

Tabela 2. Número de indivíduos (n) por instar utilizado para cada espécie e respectivos valores totais.

Espécie	Instar					Total
	I	II	III	IV	V	I- V
<i>Agraulis vanillae</i>	20	20	20	20	20	100
<i>Dione juno</i>	20	20	20	20	20	100
<i>Philaethria wernickei</i>	18	10	13	8	5	54
<i>Dryas iulia</i>	20	20	20	20	20	100
<i>Eueides aliphera</i>	9	8	8	9	6	40
<i>Heliconius sara</i>	10	8	7	8	6	39
<i>Heliconius erato</i>	20	20	20	20	20	100
<i>Heliconius ethilla</i>	20	20	20	20	20	100
Total	137	126	128	125	117	633

Morfometria Geométrica

As cápsulas cefálicas, dissecadas com auxílio de uma tesoura oftalmológica, foram fotografadas em vista frontal, imersas em álcool 70%, com câmera digital Nikon-Coolpix® 995 - acoplada a um microscópio estereoscópico Wild® M5.

Foram selecionados como marcos anatômicos (Fig.1) bases de cerdas e limites entre suturas. Tais estruturas são presentes em todos heliconíneos, num arranjo espacial relativamente constante (Fleming 1960). Seguimos, portanto, os critérios de homologia filogenética e topológica. Em geral, no primeiro instar todas as cerdas são simples, e a partir do segundo, algumas podem ser substituídas por escolos, os quais correspondem a projeções espessas e esclerotizadas (Stehr 1987).

A digitação dos marcos anatômicos e sua localização em coordenadas cartesianas foi realizada no programa TPSdig 2.10 (Rohlf 2006). As matrizes das coordenadas brutas foram analisadas através de linguagem e ambiente "R", versão 2.7.0 (R Development Core Team 2008).

Para a análise da forma, foi aplicado o método de sobreposição de Procrustes (Rohlf & Slice 1990) tanto para as comparações ontogenéticas (sobreposição de todos os instares para cada espécie) quanto para as comparações interespecíficas (sobreposição de todas as espécies para cada instar). O método de sobreposição de Procrustes baseia-se nos seguintes passos: 1) normaliza todas as configurações a um tamanho centróide unitário; 2) translada todas as configurações de modo que seus centróides sobreponham-se em uma origem comum e 3) seleciona um ângulo de referência – de uma dada configuração, ajustando a rotação das demais, buscando sempre minimizar a soma dos quadrados das distâncias entre os marcos anatômicos homólogos dentre todas as configurações.

Posteriormente, com os resíduos das sobreposições de Procrustes - equivalentes às variáveis de forma - foram realizadas Análises de Componentes Principais (ACP). Este tipo de análise apresenta a vantagem de resumir a informação contida nas variáveis originais em apenas alguns componentes principais (PCs), nos quais maximiza a variância da amostra. Assim, possibilita visualizar o ordenamento dos grupos (aqui representados por instares e espécies - associados respectivamente às comparações ontogenéticas e interespecíficas) nos eixos de maior variação. Cabe ressaltar que nesse método de ordenamento as variáveis analisadas correspondem a funções de covariância entre as variáveis originais (x , y), o que simplifica a descrição das diferenças na forma entre os indivíduos da amostra. Porém, os agrupamentos em ACP não representam unidades estatisticamente distintas.

Para testar a significância da variação ontogenética e interespecífica da forma, foram realizadas análises multivariadas da variância (MANOVA) sobre os resíduos de sobreposição de Procrustes (Dryden & Mardia 1998).

Foram realizadas análises das deformações relativas (*Relative Warps Analysis* - RWA), com utilização de $\alpha=0$ (que dá igual peso aos componentes da análise), no programa TPSrelw 1.11 (Rohlf 2008). As deformações relativas foram, então, graficamente representadas pela função *Thin Plate Splines* (TPS), cujos coeficientes correspondem aos escores das deformações parciais (Adams & Rosenberg 1998).

A função TPS caracteriza as diferenças na forma através de deformações em uma placa infinitamente fina de proporções lineares infinitas, para ajustar uma configuração de marcos anatômicos que esteja sobre a placa a uma configuração que esteja abaixo desta (Bookstein 1996, Monteiro & Reis 1999).

Foram analisadas as relações de proximidade fenotípica entre os instares (comparações ontogenéticas) e entre as espécies (comparações interespecíficas) através de distâncias de Mahalanobis (Mahalanobis 1936) e árvores de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) (NJ) das distâncias de Mahalanobis, em formato não enraizado.

A presença de alometrias foi testada através de testes de correlação de Pearson entre a forma (utilizando o primeiro componente principal obtido a partir da ACP) e o tamanho de centróide, ao longo da ontogênese de cada espécie (alometria ontogenética), e entre as espécies (alometria filogenética) para cada instar.

Foi realizada uma comparação interespecífica geral, incluindo todos os instares. Nesse caso, para facilitar a visualização gráfica da ACP, esta foi realizada apenas com as médias dos escores das respectivas espécies. Foi também analisada a relação de proximidade fenotípica, por meio das distâncias de Mahalanobis e respectiva árvore de Neighbor-Joining.

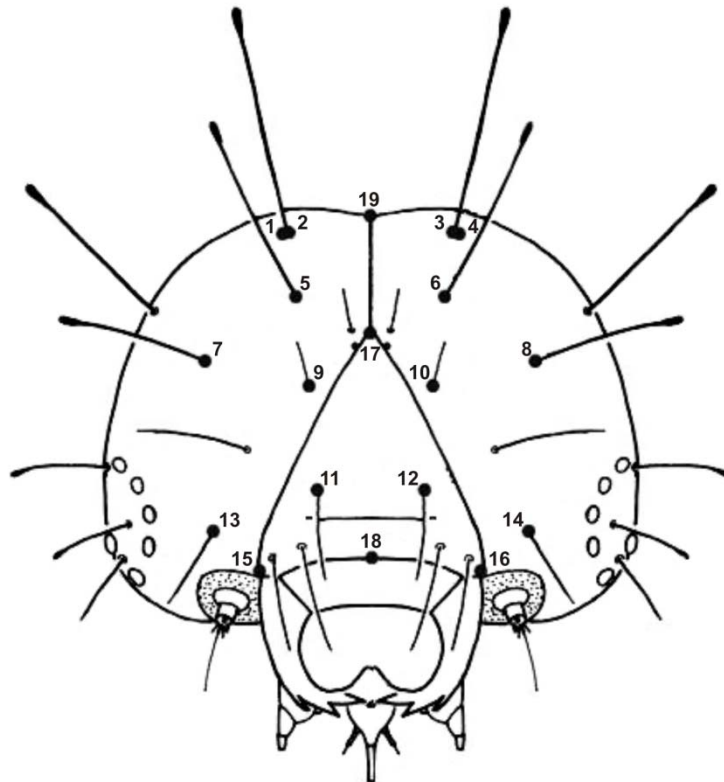


Fig.1. Marcos anatômicos: 1-2, 3-4 – bases das cerdas posteriores P2 (denominados escolos a partir do segundo instar); 5,6 - par de cerdas posteriores P1; 7,8 – par de cerdas laterais L1; 9,10 – par de cerdas adfrontais AF1; 11,12 – par de cerdas frontoclipeais F1; 13,14 – par de cerdas anteriores A1; 15,16 – extremidades da base do frontoclípeo; 17- extremidade superior do frontoclípeo; 18 – ponto médio da base do frontoclípeo; 19 – limite posterior da sutura epicranial. Modificado de Silva *et al.* (2006).

Análise filogenética

As relações filogenéticas entre as oito espécies de heliconíneos analisadas nesse estudo foram reconstruídas a partir de 3.824 nucleotídeos -seqüenciados de regiões mitocondriais (Citocromo Oxidase e 16S) e nucleares (*Elongation factor-1 α* , *apterous*, *decapentaplegic* e *wingless*) -, utilizadas por Beltrán *et al.* (2007). Com exceção da espécie *Philaethria wernickei*, a qual não foi analisada por Beltrán *et al.* (2007), neste caso, a título de comparação, utilizamos as seqüências de *Philaethria dido*.

Foram utilizados os métodos de Máxima Verossimilhança (MV) e distância (Neighbor-Joining) através do programa PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002), e Bayesiana no software MrBayes 3.0b4 (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

O modelo de evolução das seqüências para todo o conjunto de genes foi estimado de acordo com o critério de informação de Akaike (GTR+I+G) utilizando o programa ModelTest 3.7 (Posada & Crandall 1998). A árvore de MV utilizou a busca heurística através da árvore inicial de NJ, e o colapso dos ramos através de *Tree-bisection reconnection* (TBR), no programa PAUP*. Efetuou-se 100 replicações de *bootstrap* não-paramétrico (Felsenstein 1985), utilizando a opção FASTSTEP para obter a confiança da topologia da árvore.

Para a análise de distância foram construídas árvores no PAUP* utilizando o método de NJ (Saitou & Nei 1987). A confiabilidade das árvores foi testada utilizando 1.000 replicações de *bootstrap* (Hedges 1992).

A análise bayesiana foi estimada com base no modelo evolutivo que mais se ajustou aos dados (GTR+I+G), implementado no programa MrModelTest 2.2 (Nylander 2004). Quatro cadeias de Markov e Monte Carlo foram rodadas simultaneamente;

cada cadeia foi iniciada a partir de uma árvore aleatória, e replicada para um milhão de gerações, amostrando uma árvore a cada centésima geração. Os escores dos valores de verossimilhança das amostras foi plotado contra o tempo de geração para determinar quando a cadeia se tornou estacionária. Todos os pontos amostrais anteriores à estabilidade (2.000 árvores) foram descartados como amostras *burn in*. Os dados remanescentes após o descarte de amostras *burn in* foram utilizados para gerar uma árvore consenso de regra majoritária, onde a porcentagem de amostras recobrindo qualquer clado em particular representaram a probabilidade posterior do clado (Ronquist & Huelsenbeck 2003). As probabilidades acima de 90% foram consideradas indicativas de significância de suporte.

Também, foi gerada uma matriz de distância entre as seqüências das oito espécies através do método de máxima composição de verossimilhança, assumindo a distância de Tamura & Nei (1993), no software Mega 4.0 (Tamura *et al.* 2007). A verossimilhança composta é definida como a soma de valores de verossimilhança relacionados. Tamura *et al.* (2004) demonstraram que a distância pareada e os parâmetros de substituição relacionados são estimados com precisão através da maximização da verossimilhança composta.

Esta matriz de distância foi correlacionada com as matrizes obtidas a partir de dados morfogeométricos (distâncias de Mahalanobis), para o primeiro e quinto instares, utilizando o teste de Mantel (Mantel 1967) com 10000 permutações ($\alpha = 0.05$) no programa XLstat[®].

RESULTADOS

Análises ontogenéticas

A MANOVA realizada para testar se existem diferenças na forma das cápsulas cefálicas entre os instares foi altamente significativa para todas as espécies (Tab.3).

As análises de ordenamento dos componentes principais para comparação da forma entre os instares de cada espécie (Fig.2A-B) mostraram, para todas as espécies, que o primeiro componente principal (PC1), o qual contém uma grande proporção da variância explicada (de 37% em *H. erato* a 71% em *H. sara*), diferencia claramente o primeiro instar dos demais. A ordenação dos demais instares segue a ordem ontogenética; ou seja, L2 está ordenado mais próximo de L3 do que aos outros instares no PC1, e assim sucessivamente. Esta observação é corroborada pelo pequeno grau de diferenciação dos instares no segundo componente principal (PC2) – segundo componente de maior variação. Em *A. vanillae*, *D. juno*, *D. iulia*, *H. sara* e *H. erato* não há praticamente nenhuma diferenciação no PC2 entre os instares 2 a 5. Isto é uma indicação de que o maior eixo de variação de forma domina a totalidade da modificação ontogenética.

Porém, este não é o caso para *P. wernickei*, *E. aliphera* e *H. ethilla*, onde o PC2 separa os instares 2-5. Nesses casos, o padrão de variação da forma parece mais complexo e responde a dois eixos de maior variação.

As análises das deformações relativas ao longo da ontogênese de cada espécie - visualizadas através da função *thin plate splines* (Figs. 3-10), permitiram identificar que a região posterior da cápsula cefálica (Fig.1, marcos anatômicos 1, 2, 3, 4) cresce, em largura, proporcionalmente mais que a região anterior (marcos anatômicos 13, 14).

A região frontoclipeal (marcos anatômicos 11, 12, 13, 14, 17) e as cerdas AF1 (marcos anatômicos 9, 10) não apresentaram grandes alterações posicionais. Entretanto, no contexto geral das espécies, é possível notar que, do primeiro aos demais instares, há um crescimento proporcionalmente menor da área frontoclipeal, em relação ao crescimento da cápsula cefálica em áreas direcionadas lateralmente e/ou posteriormente, onde, de fato, ocorrem as mais evidentes transformações ontogenéticas.

Em quase todas as espécies, as distâncias de Mahalanobis (Tab.4) - também representadas em árvores de Neighbor-Joining (Figs. 11-18) - entre o primeiro instar e os demais foi maior em relação às outras distâncias entre instares; com exceção da espécie *P. wernickei*, em que a maior distância se deu entre L2 e L5, estando, desse modo, L1 mais próximo de L5 comparativamente à L2. Em relação aos demais instares de *P. wernickei*, seguiram maiores as distâncias do primeiro instar, em relação à L3 e L4.

Apenas em *D. juno* e *D. iulia*, as distâncias de Mahalanobis foram crescentes ao longo dos instares, i.e., seguiram a seqüência L1-L2-L3-L4-L5. Para as demais espécies, a ordem de proximidade morfométrica entre os instares não seguiu um padrão linear, ou seja, não houve relação com a ontogenia. Em *A. vanillae*, a seqüência de distâncias entre o primeiro instar e os demais foi L1-L3-L2-L4-L5; em *P. wernickei*, L1-L4-L2-L5; em *E. aliphera*, L1-L2-L5-L3-L4; em *H. sara*, L1-L2-L4-L3-L5; em *H. erato*, L1-L3-L2-L4-L5; e em *H. ethilla*, L1-L3-L2-L4-L5.

As análises de correlação de Pearson (Tab.5, Fig.19A-B) efetuadas para testar a relação entre a forma (PC1) e o tamanho do centróide, ao longo da ontogênese, foram significativas para todas as espécies.

Tabela 3. Resultados das MANOVAs realizadas para testar as variações ontogenéticas na forma das cápsulas cefálicas em oito espécies de heliconíneos.

Espécies	Pillai	F aprox.	Pr(>F)
<i>Agraulis vanillae</i>	2.5473	4.2324	$< 2.2e^{-16}$
<i>Dione juno</i>	3.0281	7.5208	$< 2.2e^{-16}$
<i>Philaethria wernickei</i>	3.1859	3.7682	$2.715e^{-11}$
<i>Dryas iulia</i>	2.6971	4.9966	$< 2.2e^{-16}$
<i>Eueides aliphera</i>	3.5986	3.9847	$2.852e^{-07}$
<i>Heliconius sara</i>	3.8734	6.9103	$9.16e^{-08}$
<i>Heliconius erato</i>	3.2473	10.4128	$< 2.2e^{-16}$
<i>Heliconius ethilla</i>	2.8537	6.0092	$< 2.2e^{-16}$

A

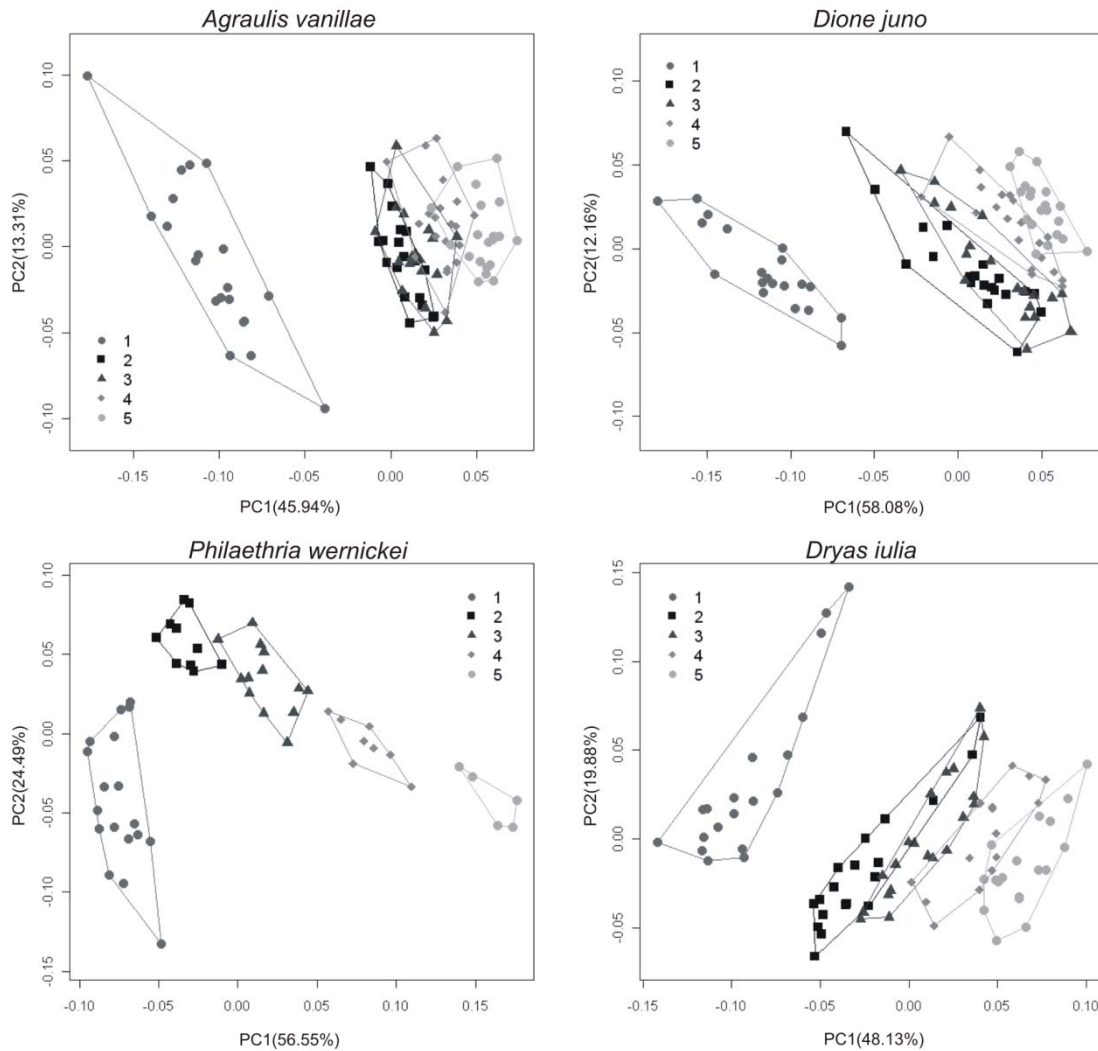


Figura 2 A-B. Ordenamento dos instares nos componentes 1 e 2 das análises de componentes principais, realizadas com os resíduos de sobreposição de Procrustes, para a forma da cápsula cefálica ao longo da ontogênese em oito espécies heliconíneos. Entre parênteses as porcentagens de variância explicadas por cada eixo.

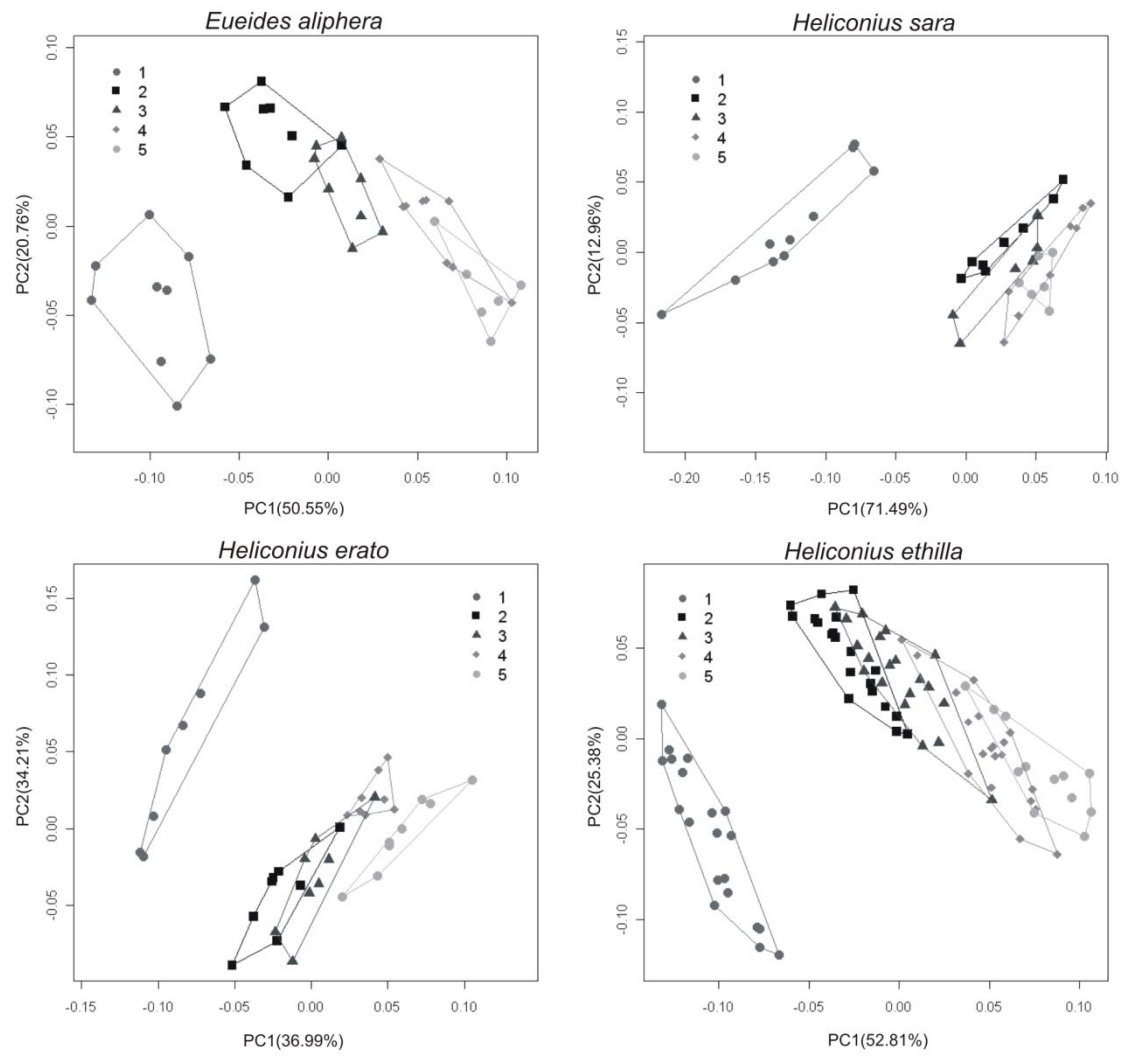
B

Figura 2. Continuação.

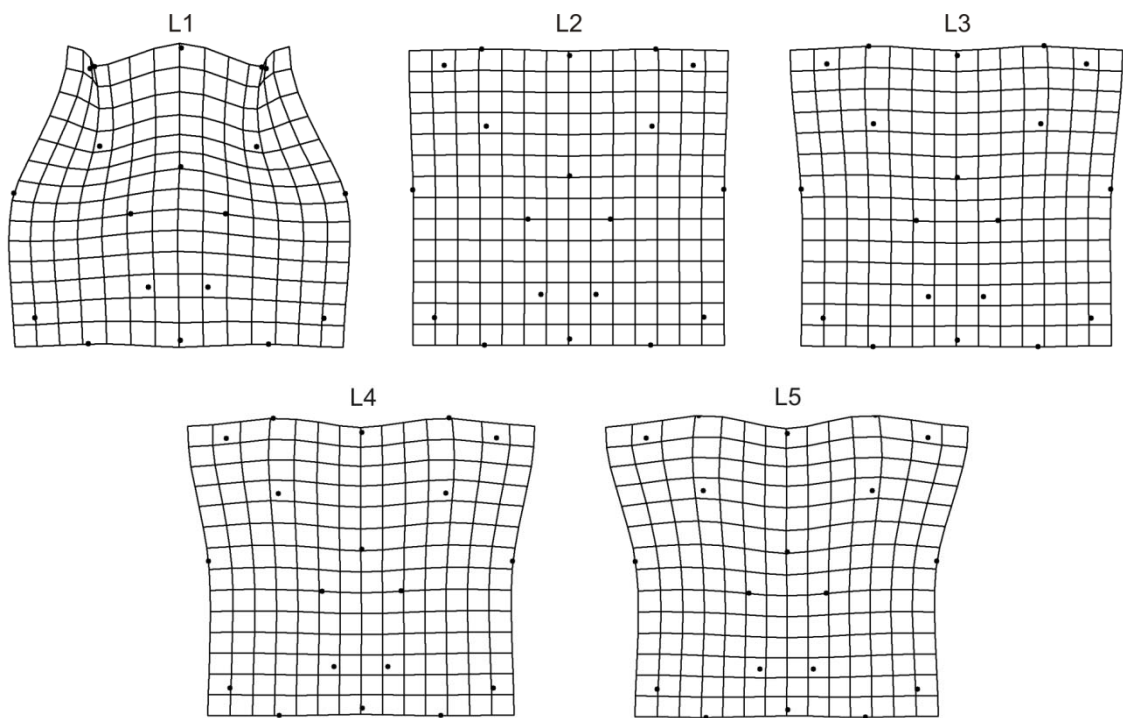


Figura 3. Deformações relativas - visualizadas através da função *thin plate splines* - das cápsulas cefálicas ao longo da ontogênese de *Agraulis vanillae*.

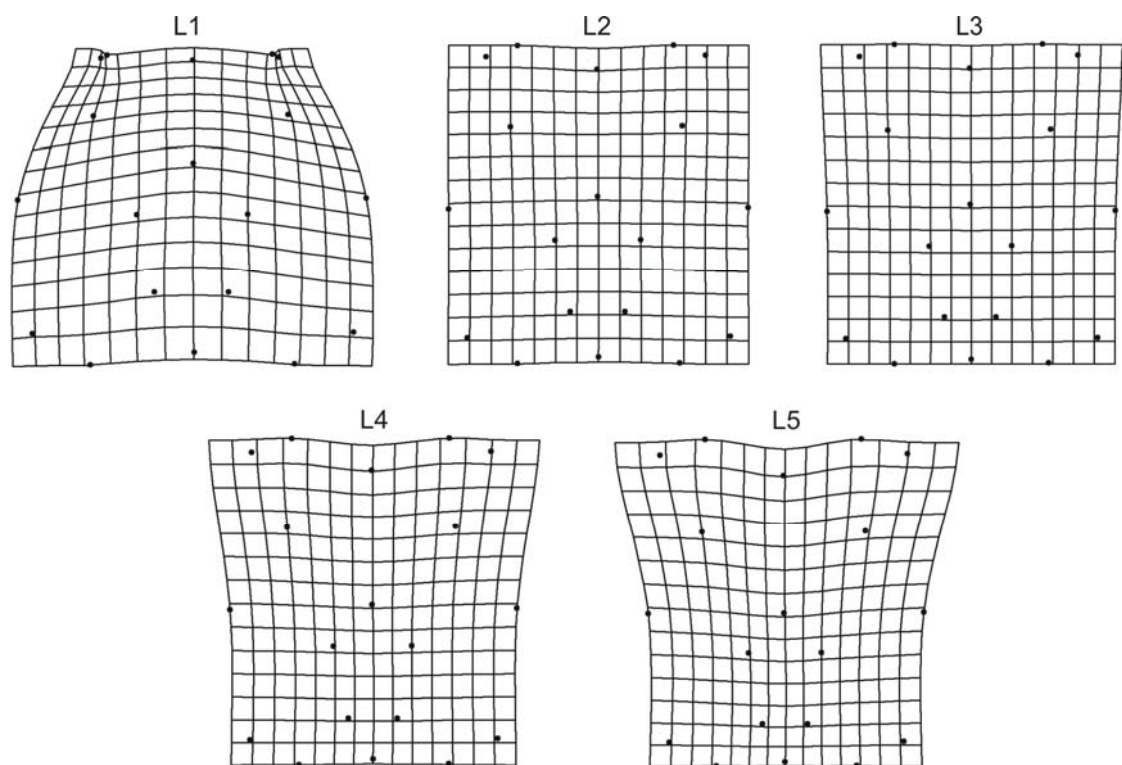


Figura 4. Deformações relativas - visualizadas através da função *thin plate splines* - das cápsulas cefálicas ao longo da ontogênese de *Dione juno*.

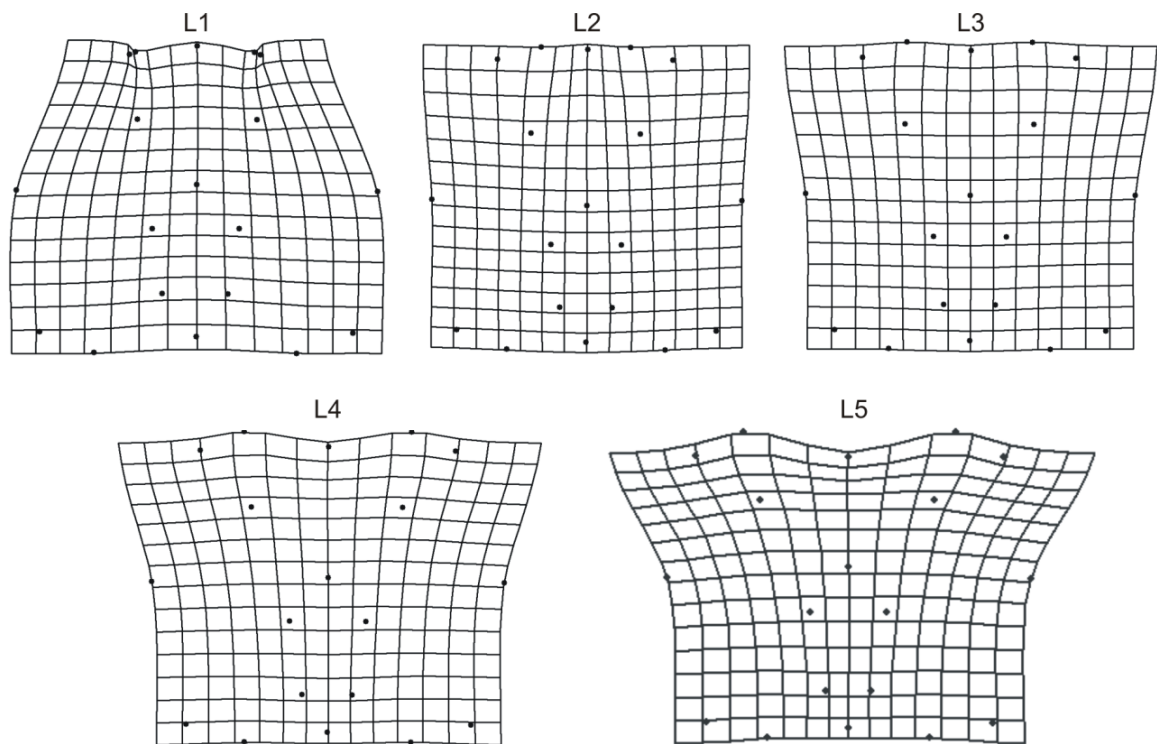


Figura 5. Deformações relativas - visualizadas através da função *thin plate splines* - das cápsulas cefálicas ao longo da ontogênese de *Philaethria wernickei*.

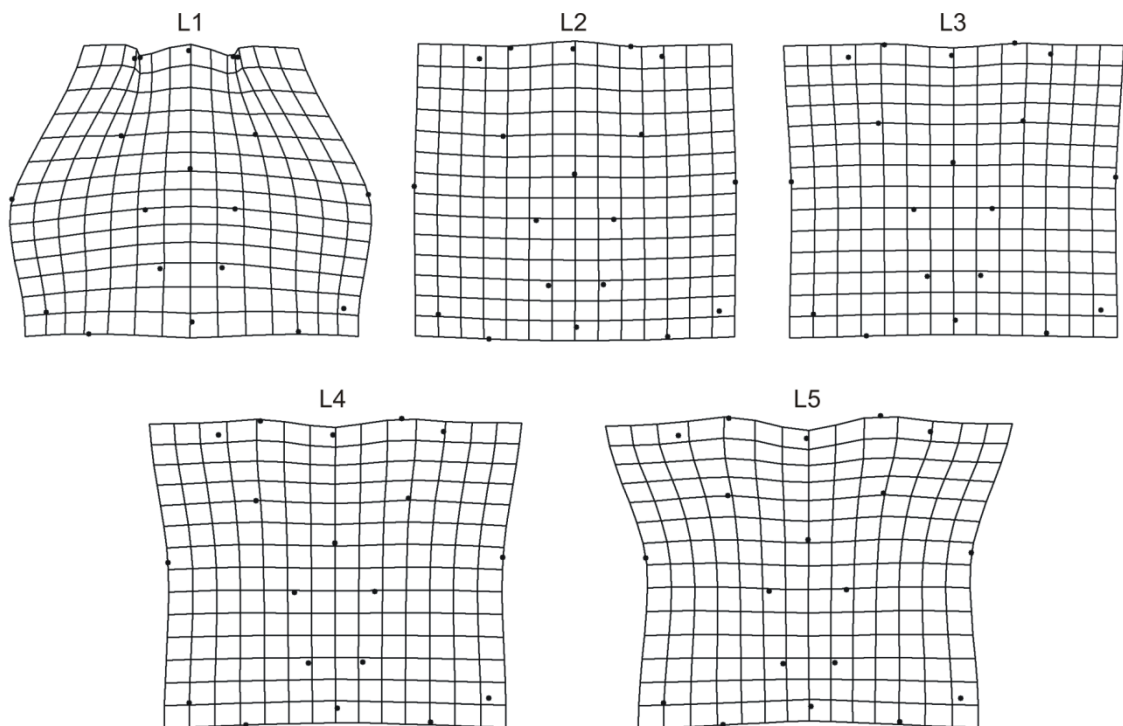


Figura 6. Deformações relativas - visualizadas através da função *thin plate splines* - das cápsulas cefálicas ao longo da ontogênese de *Dryas iulia*.

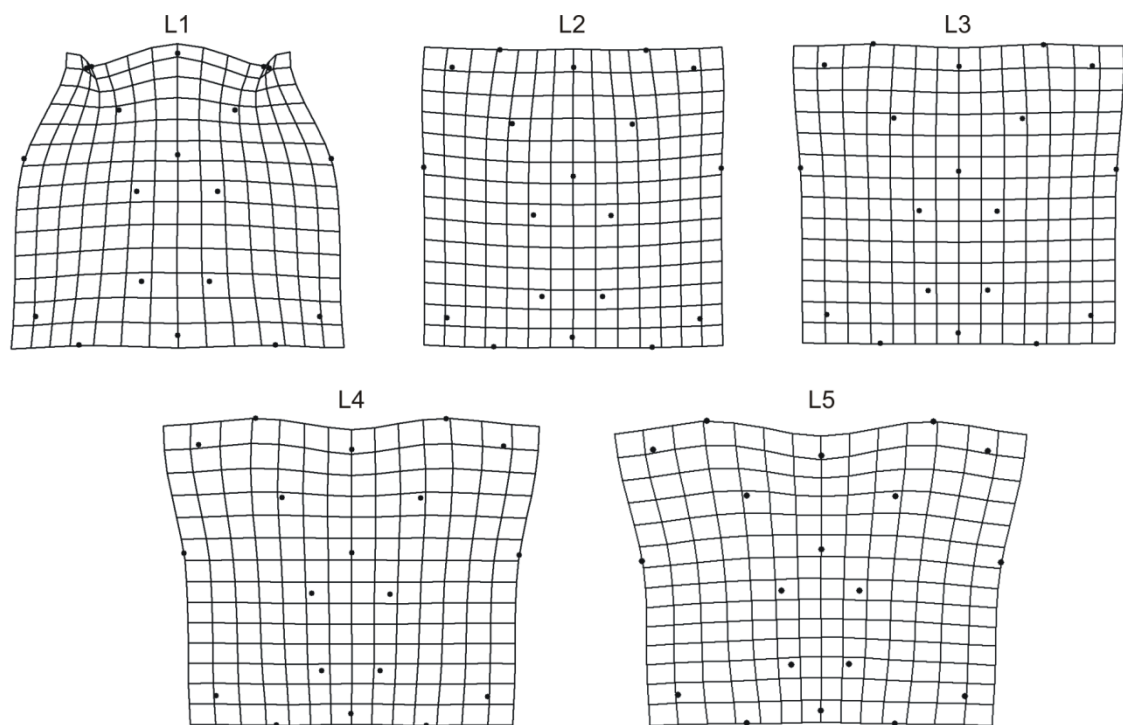


Figura 7. Deformações relativas - visualizadas através da função *thin plate splines* - das cápsulas cefálicas ao longo da ontogênese de *Eueides aliphera*.

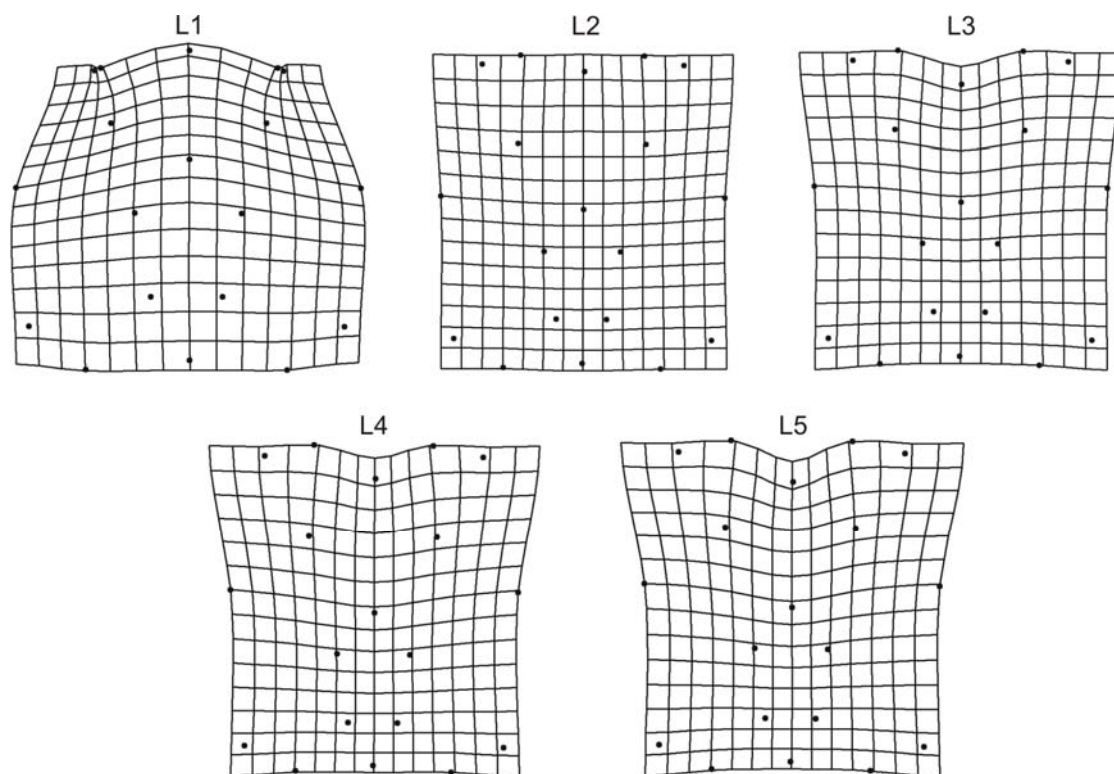


Figura 8. Deformações relativas - visualizadas através da função *thin plate splines* - das cápsulas cefálicas ao longo da ontogênese de *Heliconius sara*.

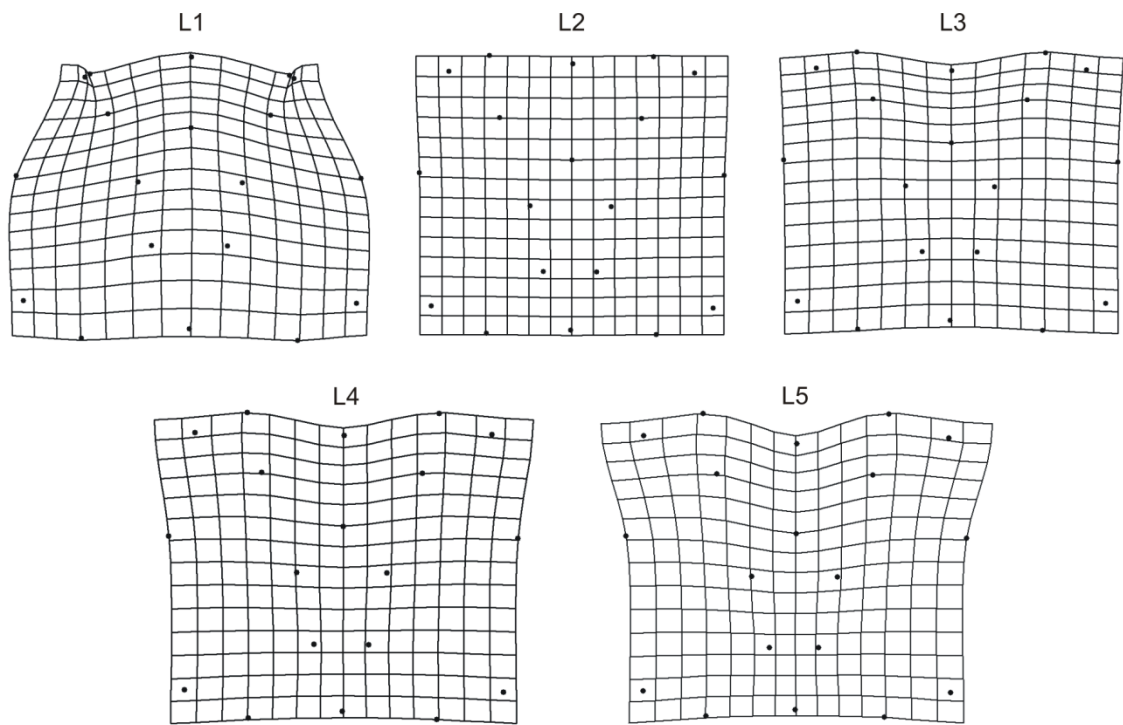


Figura 9. Deformações relativas - visualizadas através da função *thin plate splines* - das cápsulas cefálicas ao longo da ontogênese de *Heliconius erato*.

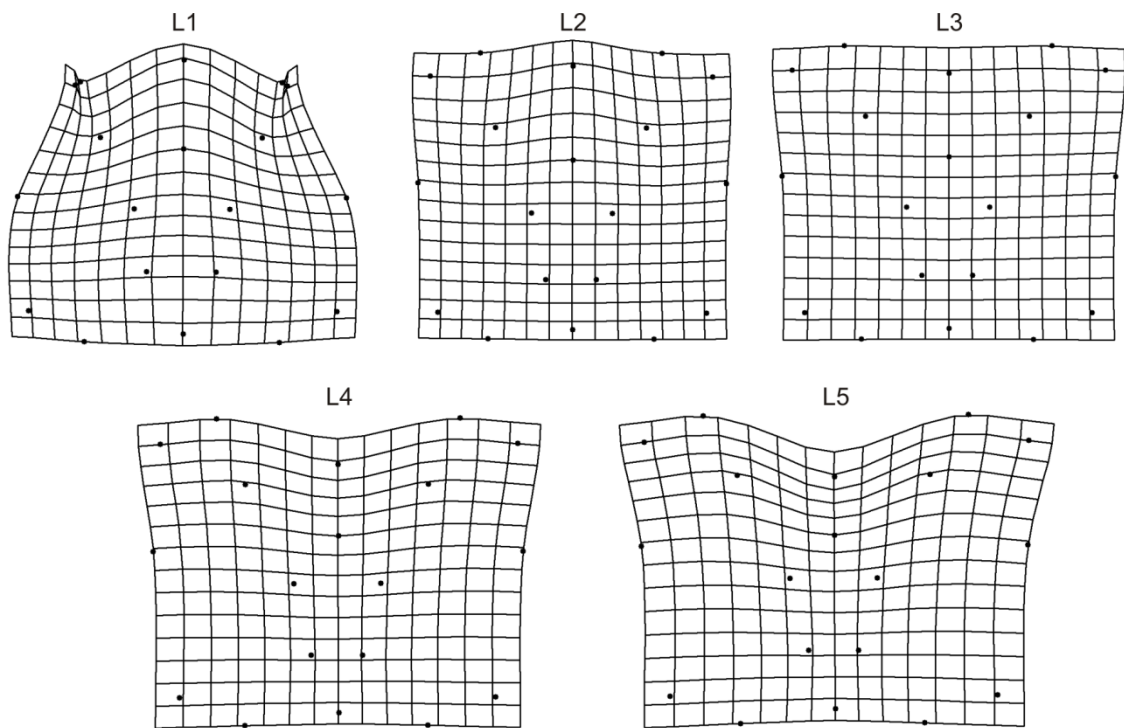


Figura 10. Deformações relativas - visualizadas através da função *thin plate splines* - das cápsulas cefálicas ao longo da ontogênese de *Heliconius ethilla*.

Tabela 4. Distâncias de Mahalanobis entre os instares em oito espécies de heliconíneos.

Espécie	Instares				
	L1	L2	L3	L4	
<i>Agraulis vanillae</i>	L2	318.5			
	L3	275.6	16.7		
	L4	325.8	35.6	12.8	
	L5	374.5	69.6	28.4	13.1
<i>Dione juno</i>	L2	484.9			
	L3	522.9	20.7		
	L4	593.6	42.1	16.8	
	L5	617.7	96.3	64.1	32.2
<i>Philaethria wernickei</i>	L2	595.1			
	L3	565.8	94.9		
	L4	576.9	272.1	72.5	
	L5	797.8	856.3	477.9	196.7
<i>Dryas iulia</i>	L2	298.0			
	L3	313.1	12.3		
	L4	385.1	62.7	29.5	
	L5	434.1	189.5	123.8	47.9

Tabela 4. Continuação.

Espécie	Instares				
	L1	L2	L3	L4	
<i>Eueides aliphera</i>	L2	436.3			
	L3	450.7	42.6		
	L4	577.6	186.4	150.5	
	L5	450.4	188.5	114.9	89.2
<i>Heliconius sara</i>	L2	2338.4			
	L3	2980.9	81.3		
	L4	2738.5	123.6	90.71	
	L5	3110.8	298.0	202.1	139.7
<i>Heliconius erato</i>	L2	523.4			
	L3	498.6	38.1		
	L4	531.9	63.9	20.1	
	L5	599.5	140.4	73.7	40.5
<i>Heliconius ethilla</i>	L2	468.1			
	L3	432.9	46.4		
	L4	521.4	117.1	30.8	
	L5	609.4	201.7	85.9	18.4

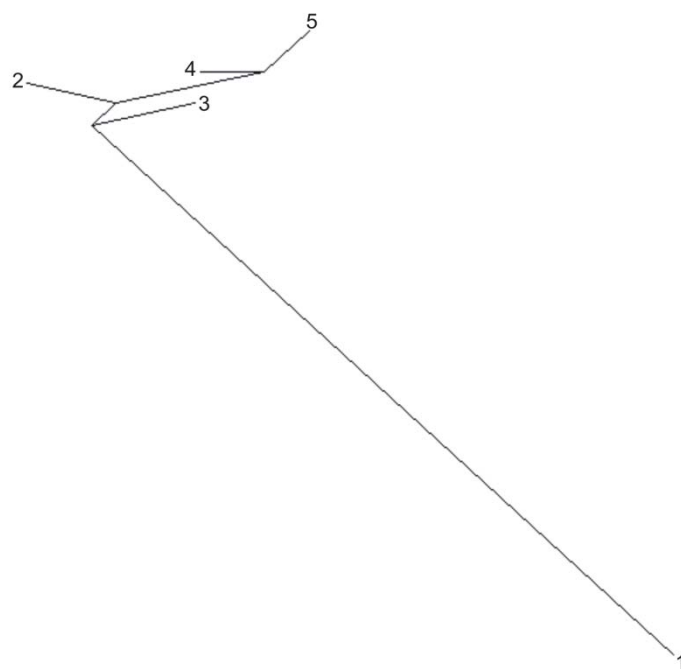


Figura 11. Árvore de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis entre os instares de *Agraulis vanillae*.

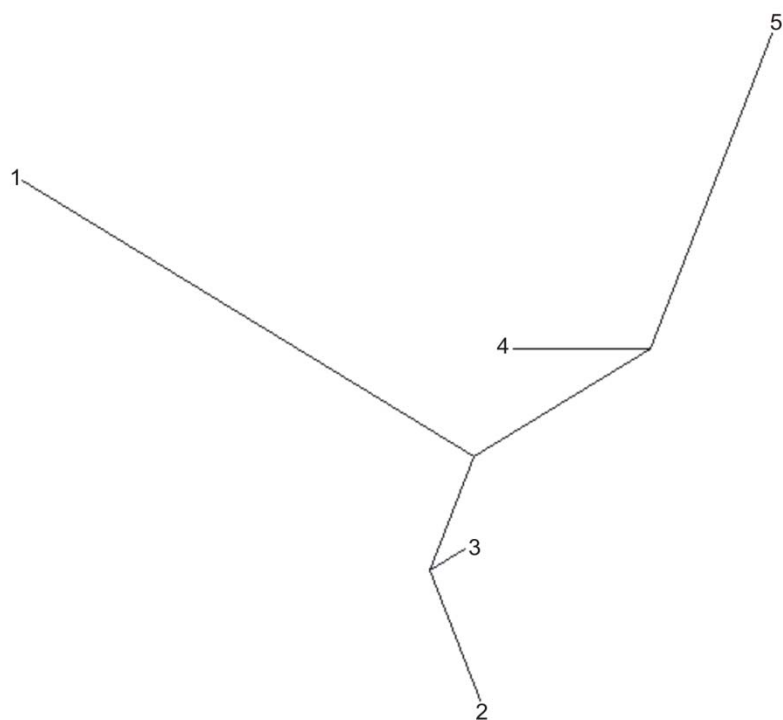


Figura 13. Árvore de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis entre os instares de *Philaethria wernickei*.

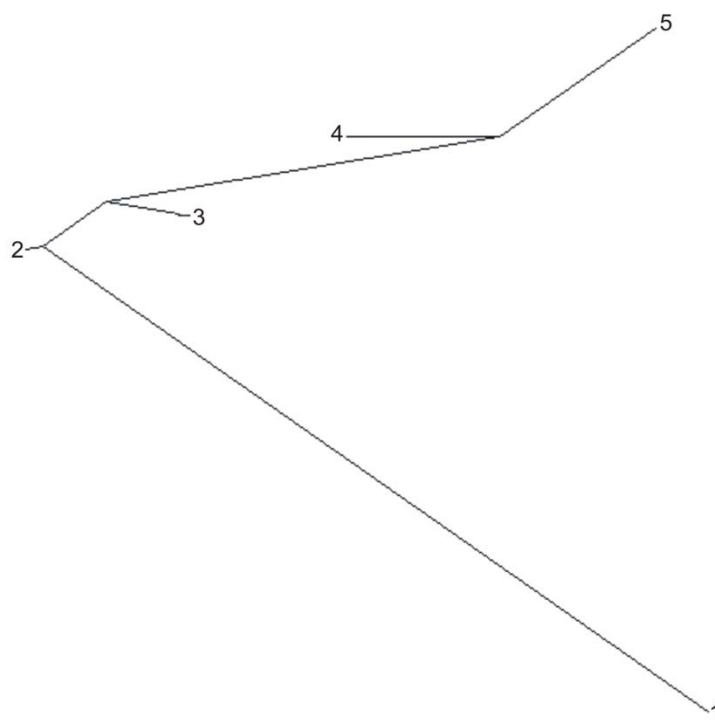


Figura 14. Árvore de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis entre os instares de *Dryas iulia*.

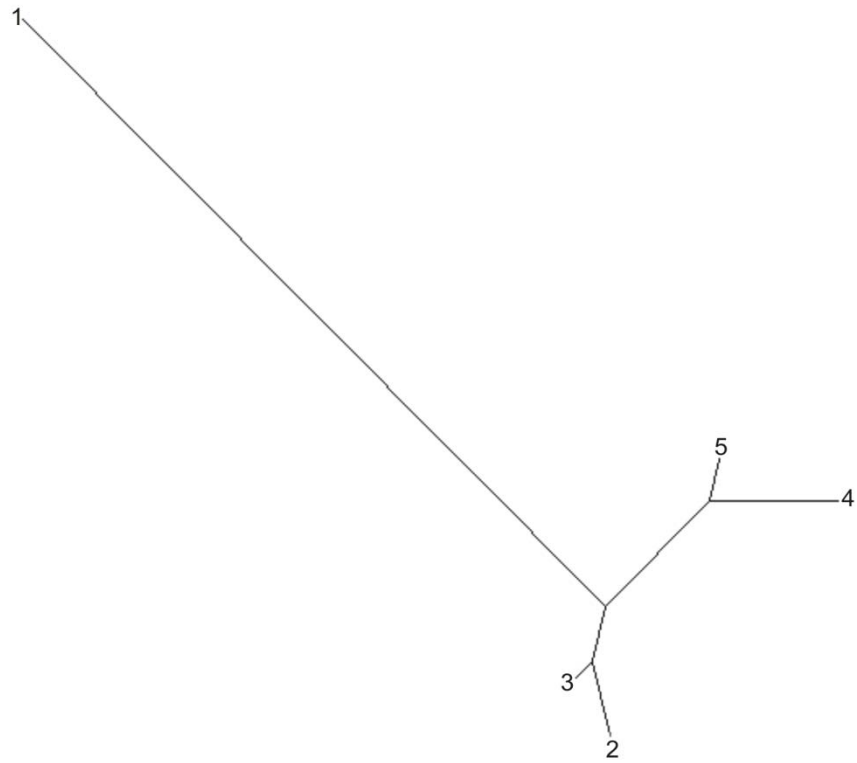


Figura 15. Árvore de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis entre os instares de *Eueides aliphera*.

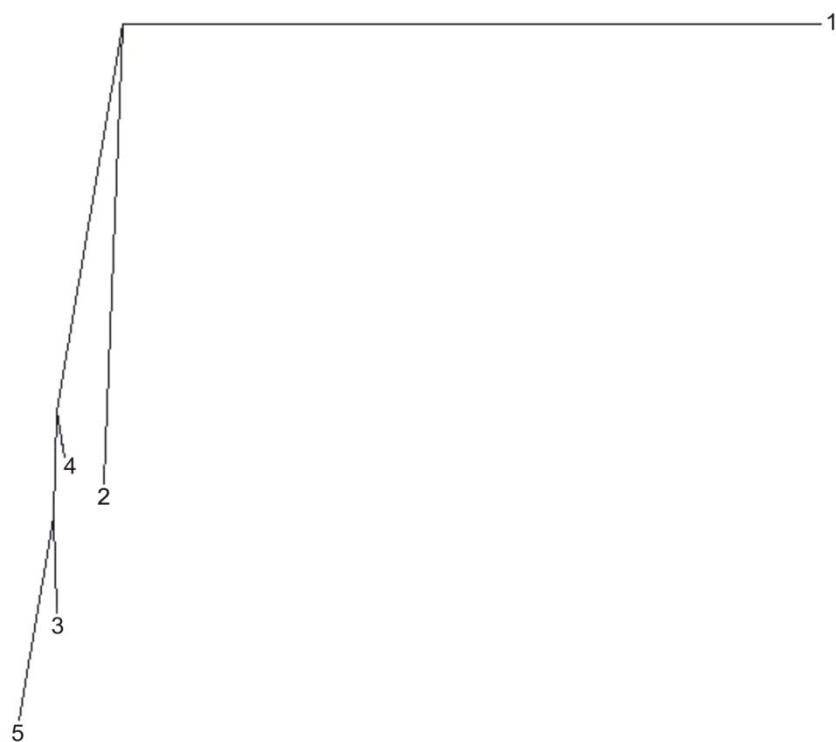


Figura 16. Árvore de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis entre os instares de *Heliconius sara*.

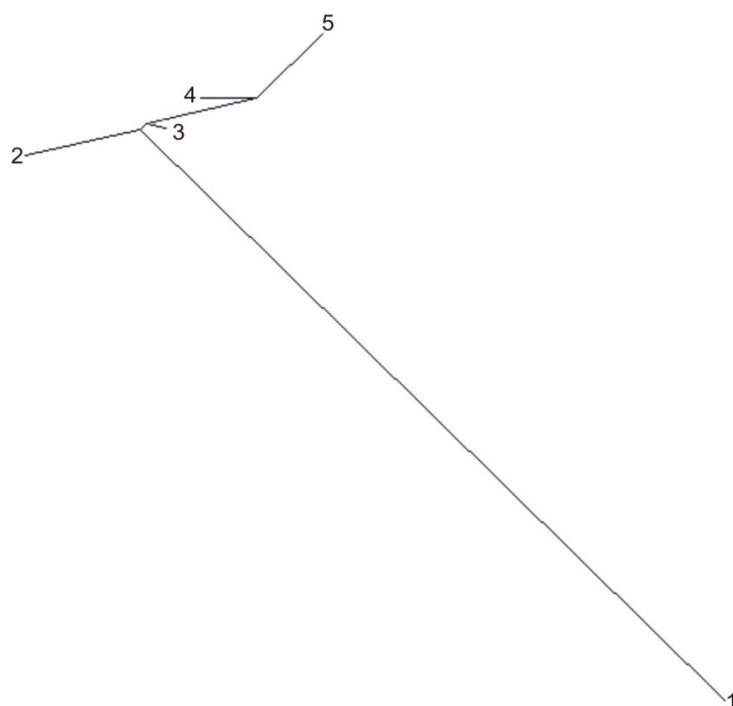


Figura 17. Árvore de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis entre os instares de *Heliconius erato*.

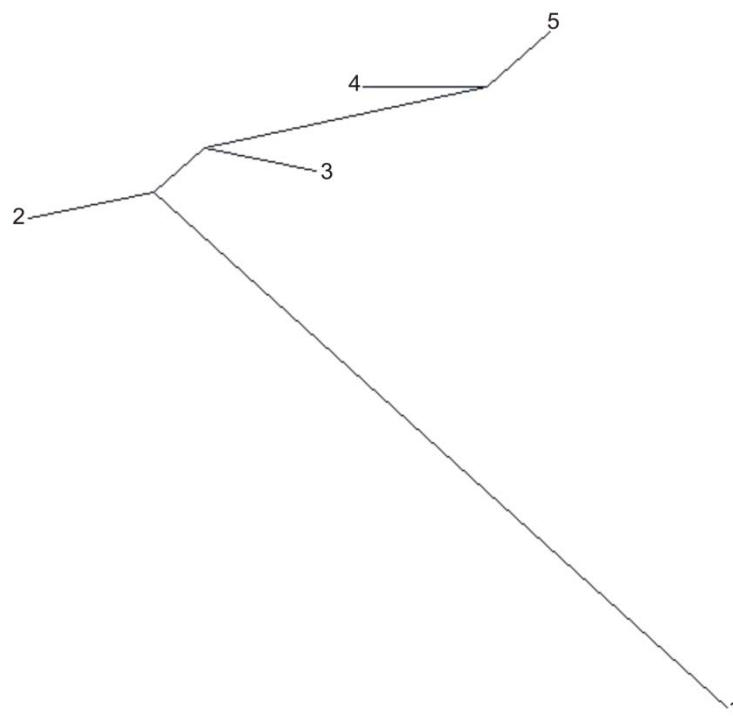


Figura 18. Árvore de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis entre os instares de *Heliconius ethilla*.

Tabela 5. Resultados das análises de correlação de Pearson entre a forma (PC1) e o tamanho do centróide ao longo da ontogênese de oito espécies de heliconíneos.

Espécies	t	correlação	valor p
<i>Agraulis vanillae</i>	11.8685	0.7679327	< 2.2e-16
<i>Dione juno</i>	9.7957	0.7033697	4.441e-16
<i>Philaethria wernickei</i>	27.3555	0.9669675	< 2.2e-16
<i>Dryas iulia</i>	13.0508	0.7967232	< 2.2e-16
<i>Eueides aliphera</i>	10.1206	0.8540474	2.444e-12
<i>Heliconius sara</i>	6.0013	0.7023242	6.253e-07
<i>Heliconius erato</i>	9.676	0.8433878	8.458e-12
<i>Heliconius ethilla</i>	16.6707	0.8598265	< 2.2e-16

A

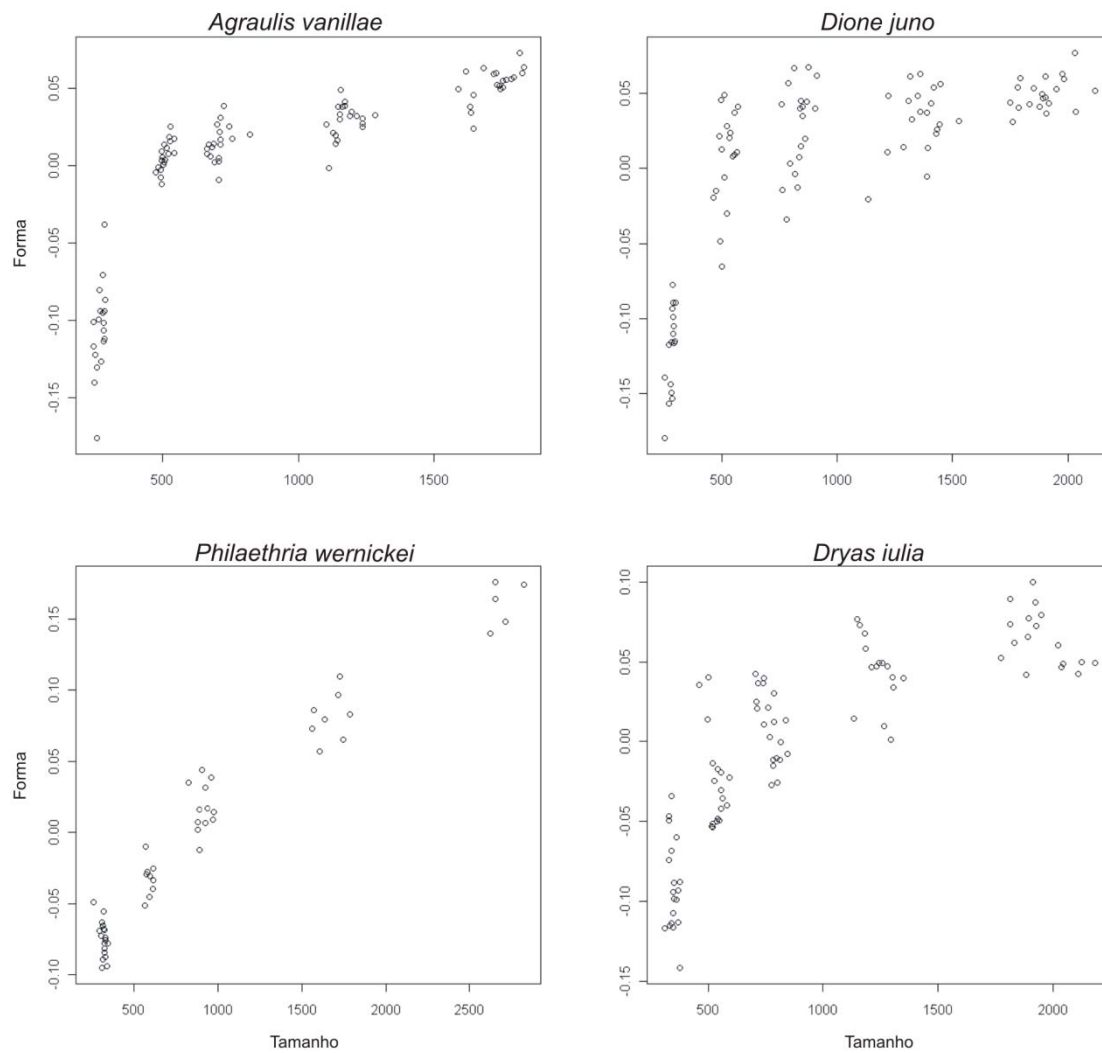


Figura 19 A-B. Correlações de Pearson entre a forma (PC1) e o tamanho de centróide ao longo da ontogênese de quatro espécies de heliconíneos.

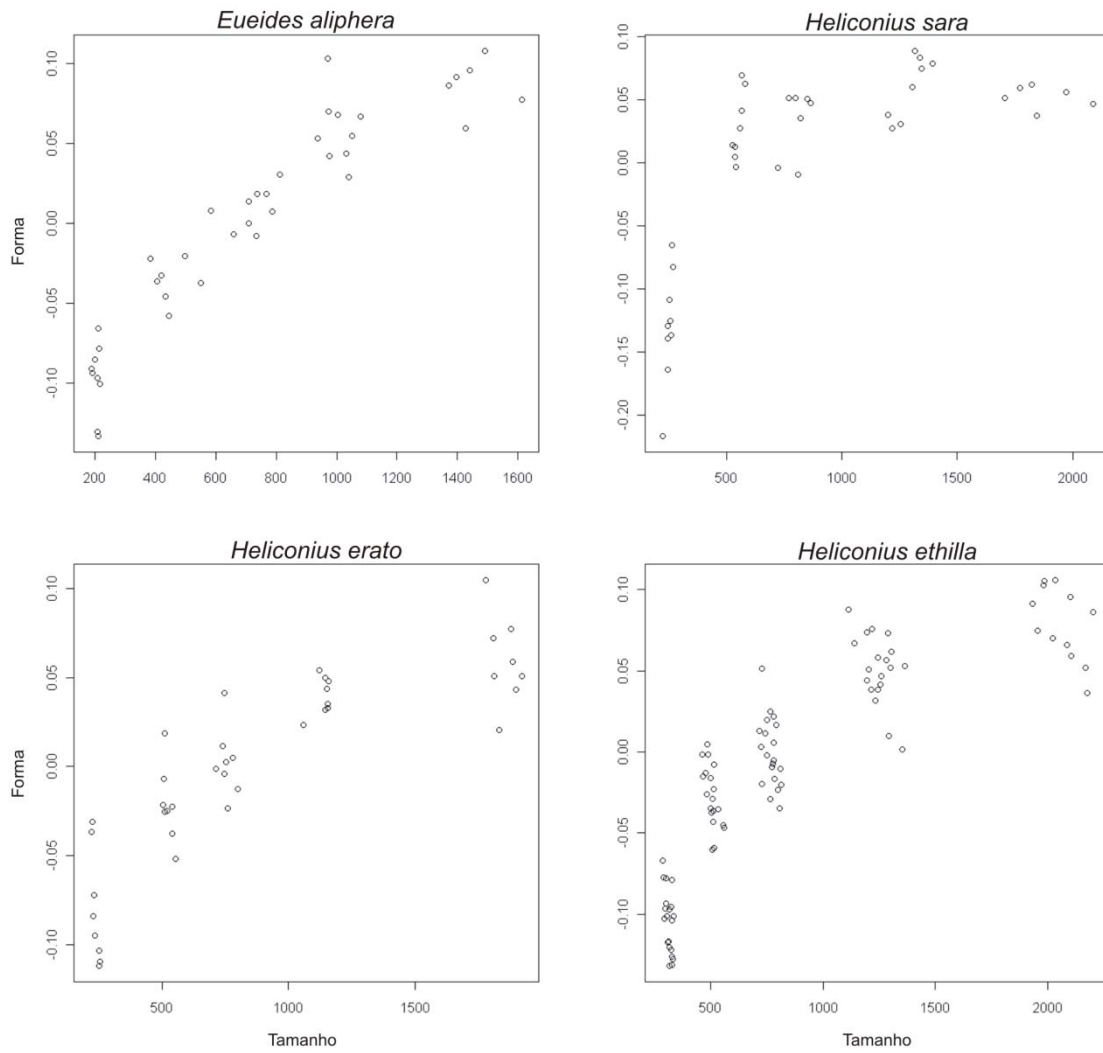
B

Figura 19. Continuação.

Análises filogenéticas

A MANOVA realizada para testar a variação interespecífica na forma da cápsula cefálica foi altamente significativa para todos os instares (Tab.6).

A proporção da variância explicada no primeiro componente principal das análises de ordenamento dos componentes principais para comparação da forma entre as espécies (Fig.20A-E) variou de 53% no primeiro instar, a 68% - no quinto.

Conforme o avanço da ontogênese, as análises de componentes principais apresentaram crescentes graus de distanciamento entre as espécies. No primeiro instar (Fig.20A), as espécies ordenaram-se relativamente muito próximas, apresentando *A. vanillae* agrupada com *H. ethilla*, *H. erato*, *H. sara*, *D. juno* e *E. aliphera*. Com altos escores no PC1, encontram-se *D. iulia* e *P. wernickei*, separadas de *A. vanillae* e das demais espécies.

No segundo instar (Fig.20B), *H. ethilla*, *H. sara*, *D. iulia* e *P. wernickei* agruparam-se isoladamente das demais espécies. Entretanto, no PC1, *H. ethilla* não se diferencia de *H. erato*, assim como *H. sara* não se diferencia de *D. juno* e de *P. wernickei*. *A. vanillae*, manteve-se, em certo grau, agrupada com *D. juno*, *E. aliphera* e *H. erato*.

No terceiro instar (Fig.20C), o PC1 separou *H. ethilla*, porém indiferenciadamente de *H. erato*, com baixos escores. *E. aliphera* e *A. vanillae* (em parte também indiferenciadas de *H. erato* e de *D. iulia*) agruparam-se com escores intermediários. Com altos escores situam-se *D. juno*, *H. sara*, *P. wernickei* e *D. iulia*.

No quarto instar (Fig.20D), *D. juno* e *H. sara* apresentaram os maiores escores no PC1, permanecendo indiferenciadas entre si. *D. iulia* e *P. wernickei* mostraram escores intermediários - juntamente com *A. vanillae*. Embora agrupada isoladamente,

H. erato, permaneceu indiferenciada de *E. aliphera* e *H. ethilla*, a qual se manteve com os menores escores. Em nível de PC2, *P. wernickei* aproxima-se de *A. vanillae*, com escores mais elevados que de *D. iulia*.

No quinto instar (Fig.20E), *D. juno* e *H. sara* apresentaram escores ainda maiores em relação às demais espécies no PC1. Entretanto, no PC2 essas duas espécies mostraram-se diferenciadas entre si. *P. wernickei* teve maiores escores no PC2 e, comparativamente aos instares anteriores, distanciou-se de *D. iulia* - aproximando-se mais de *E. aliphera* e *A. vanillae*. *H. erato* manteve-se com escores intermediários e indiferenciada de *E. aliphera*, *P. wernickei*, e em parte de *A. vanillae* e *H. ethilla*, que manteve-se com os menores escores em nível de PC1.

A proximidade fenotípica entre as espécies, representada pelas distâncias de Mahalanobis (Tab.7), não seguiu um padrão seqüencial constante ao longo dos instares, o que pode ser também visualizado nas árvores de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis (Fig.21A-E).

No primeiro instar, *A. vanillae* esteve mais próxima morfometricamente do gênero *Heliconius*, mas topologicamente, segue a sua relação filogenética com *D. juno*, *P. wernickei* e *D. iulia* (Tab.7, Fig.21A). No segundo instar (Tab.7, Fig.21B), *A. vanillae* aproxima-se de *D. juno* e seguidamente de *H. erato*. No terceiro instar (Tab.7, Fig.21C), suas menores distâncias se dão, em ordem crescente, entre *H. erato*, *E. aliphera*, *D. iulia* e *D. juno*. No quarto instar (Tab.7, Fig.21D), aproxima-se de *P. wernickei*, mantendo essa proximidade no quinto instar (Tab.7, Fig.21E), onde mantém da mesma forma sua proximidade em relação a *E. aliphera*, *H. erato* e *D. juno*, distanciando-se, porém, de *D. iulia*.

As distâncias de Mahalanobis entre *D. iulia* e *P. wernickei* foram menores reciprocamente até o terceiro instar (Tab.7, Fig.21A-C). No quarto instar (Tab.7, Fig.21D), apesar da menor distância de *D. iulia* ainda permanecer em relação a *P. wernickei*, esta relativamente torna-se mais próxima de *A. vanillae*. E no quinto instar (Tab.7, Fig.21E) *P. wernickei* distancia-se sobremaneira de *D. iulia*, aproximando-se mais de *H. erato*, *A. vanillae* e *E. aliphera*.

As representações gráficas da variação na forma, visualizadas através da função *thin plate splines*, organizadas nas árvores de Neighbor-Joining (Fig.21A-E), permitiram identificar que a proximidade morfométrica entre *P. wernickei* e *D. iulia*, do instar 1 ao 4, deve-se ao estreitamento da região posterior da cápsula cefálica, uma vez que nessas duas espécies as cerdas P2 (Fig.1, marcos anatômicos 1,2,3,4 / escolos a partir de L2) são relativamente mais próximas entre si que nas demais espécies. Entretanto, no quinto instar (Fig.21E), a distância entre os escolos de *P. wernickei* aumenta, enquanto em *D. iulia* os escolos permanecem relativamente próximos entre si.

As baixas distâncias de Mahalanobis entre *D. juno* e *H. sara* podem também ser explicadas através das representações gráficas de *thin plate splines* (Fig.21A-E). Essas duas espécies, ao longo da ontogênese investem proporcionalmente mais no crescimento em altura que em largura, o que lhes confere, a partir do segundo instar, um aspecto lateralmente estreitado em relação às demais espécies (Tab.7, Fig.21A-E).

Já *E. aliphera* e *H. ethilla* são espécies que investem proporcionalmente mais em largura que em altura, o que explica a crescente proximidade entre essas duas espécies ao longo dos instares (Tab.7, Fig.21A-E). Até o quarto instar, *H. ethilla* manteve-se próxima de *H. erato*. Porém no quinto instar, devido ao maior crescimento

em largura, *H. ethilla* e *E. aliphera* tornam-se mais próximas entre si, enquanto *H. erato* mantém seu crescimento uniforme em se tratando de largura e altura.

As análises de correlação de Pearson (Tab.8, Fig.22) efetuadas para testar a relação interespecífica entre a forma e o tamanho das cápsulas cefálicas para cada instar, resultou em valores estatisticamente significativos excetuando-se o quinto instar.

A análise dos componentes principais para comparação interespecífica utilizando-se todos os instares, e apenas as médias de cada espécie, foi analisada através dos PCs 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6 (Fig.23A-C). O maior eixo de variação (PC1) explicou 47% da variação total (Fig.23A) e não mostrou diferenciação entre as espécies, assim como os demais componentes principais analisados (Fig.23B-C). As distâncias de Mahalanobis (Tab.9) foram baixas, de um modo geral, se comparadas às distâncias das comparações interespecíficas por instar. A árvore de Neighbor-Joining correspondente (Fig.24) apresentou uma topologia resumida para todos instares.

As árvores filogenéticas com base nas seqüências nucleotídicas reconstruídas pelos métodos de Máxima Verossimilhança (MV), Neighbor-Joining e Bayesiana (Fig.25A-C) apresentaram topologias semelhantes, corroborando as relações inferidas por Beltrán *et al.* (2007) (Apêndice 1). *Heliconius* apresentou um clado monofilético bem suportado (agrupando *H. erato*, *H. ethilla* e *H. sara*), proximamente relacionado a *Eueides*, em concordância com as hipóteses moleculares prévias (Brown 1981; Brower & Egan 1997, Beltrán *et al.* 2007). As topologias com base em modelos evolutivos indicaram baixa resolução nas relações de *D. iulia*, *P. dido*, *D. junonia* e *A. vanillae*, embora a árvore de MV, assim como a de NJ, tenha agrupado *D. iulia* com *P. dido* e *D.*

juno com *A. vanillae*. Tais resultados concordam com aqueles obtidos por Beltrán *et al.* (2007).

A matriz de distância calculada a partir do número de diferenças entre seqüências pareadas (DG) é apresentado na Tabela 10. As correlações (teste de Mantel) entre a matriz das distâncias de Mahalanobis do primeiro instar *versus* DG apresentou $r = 0.27$ ($p = 0.39$), e entre o quinto instar *versus* DG, $r = 0.22$ ($p = 0.49$) (Fig.26A-B), sendo portanto não significativas.

Tabela 6. Resultados das MANOVAs realizadas para testar a variação interespecífica na forma dentro de cada instar.

Instares	Pillai	F aprox.	Pr(>F)
I	4.7476	7.7772	< 2.2e-16
II	5.1305	9.0849	< 2.2e-16
III	5.0006	8.4519	< 2.2e-16
IV	5.287	10.111	< 2.2e-16
V	5.2418	8.9440	< 2.2e-16

A

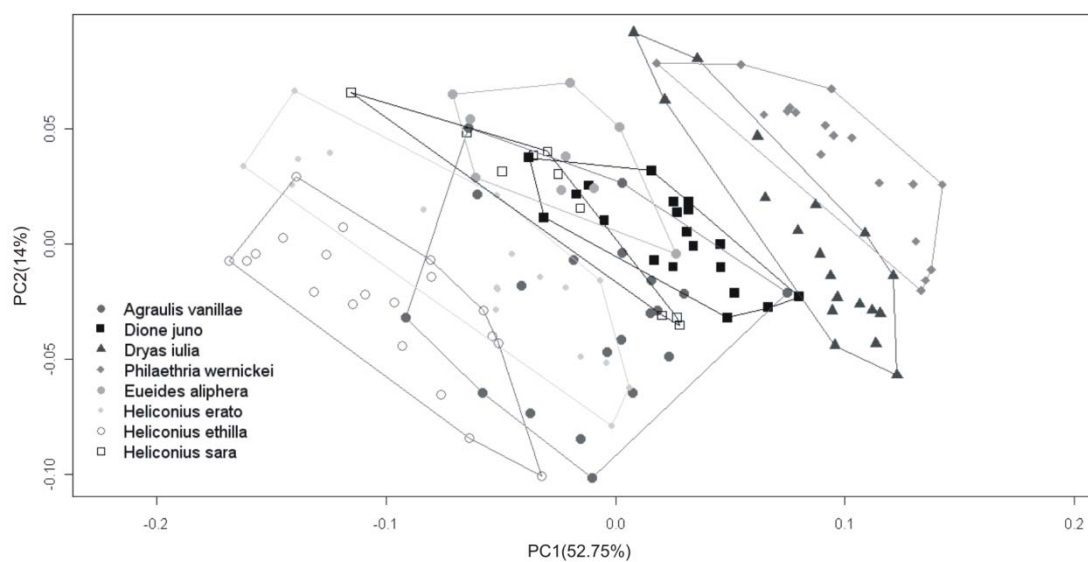


Figura 20 A-E. Ordenamento das espécies nos componentes 1 e 2 das análises de componentes principais, realizadas com os resíduos de sobreposição de Procrustes, para o primeiro (A), segundo (B), terceiro (C), quarto (D) e quinto instar (E). Entre parênteses as percentagens de variância explicadas por cada eixo.

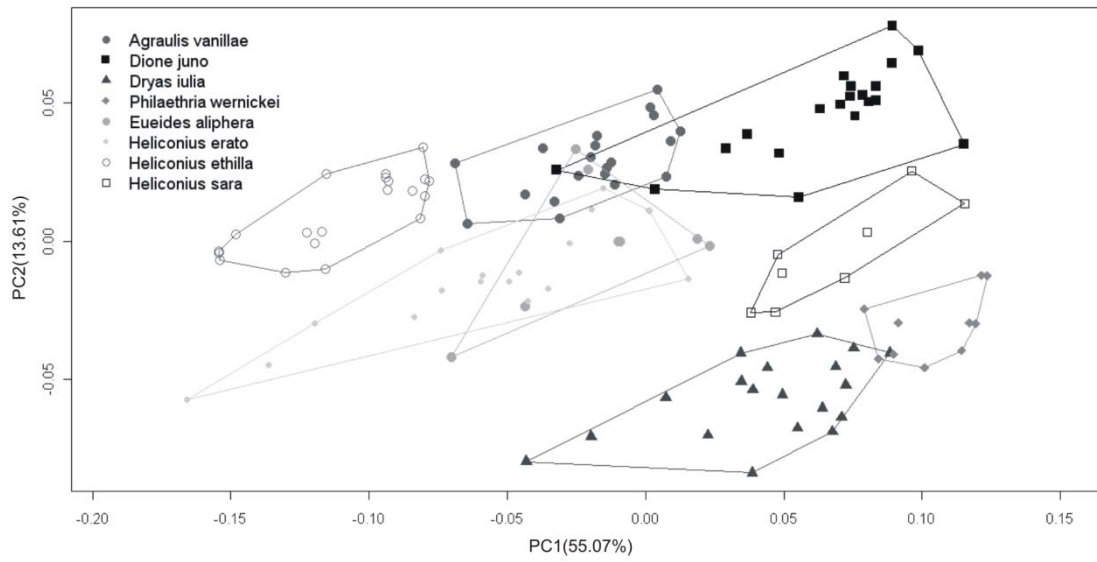
B

Figura 20. Continuação

C

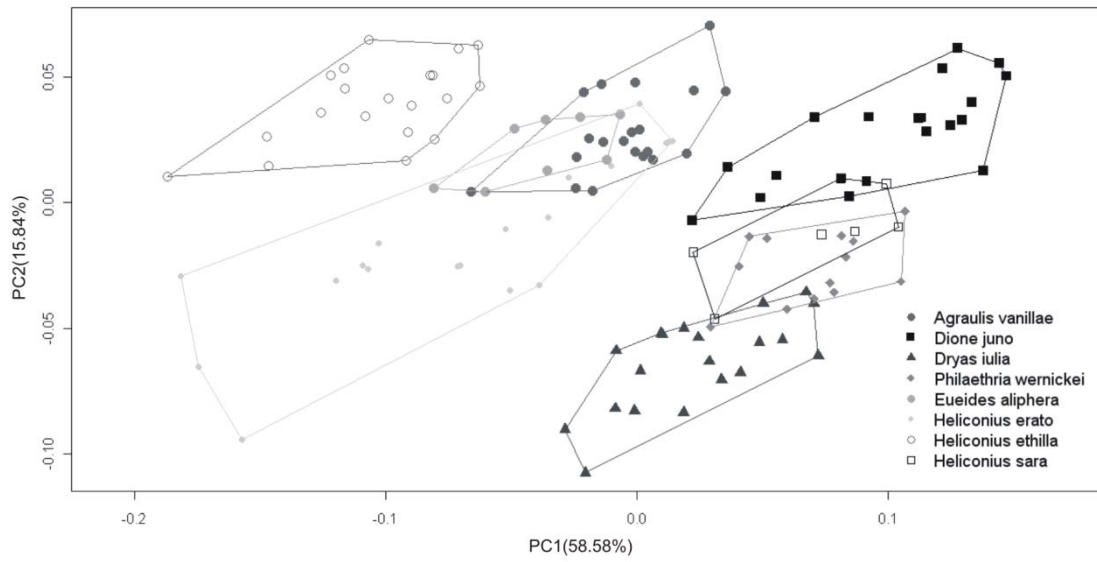


Figura 20. Continuação

D

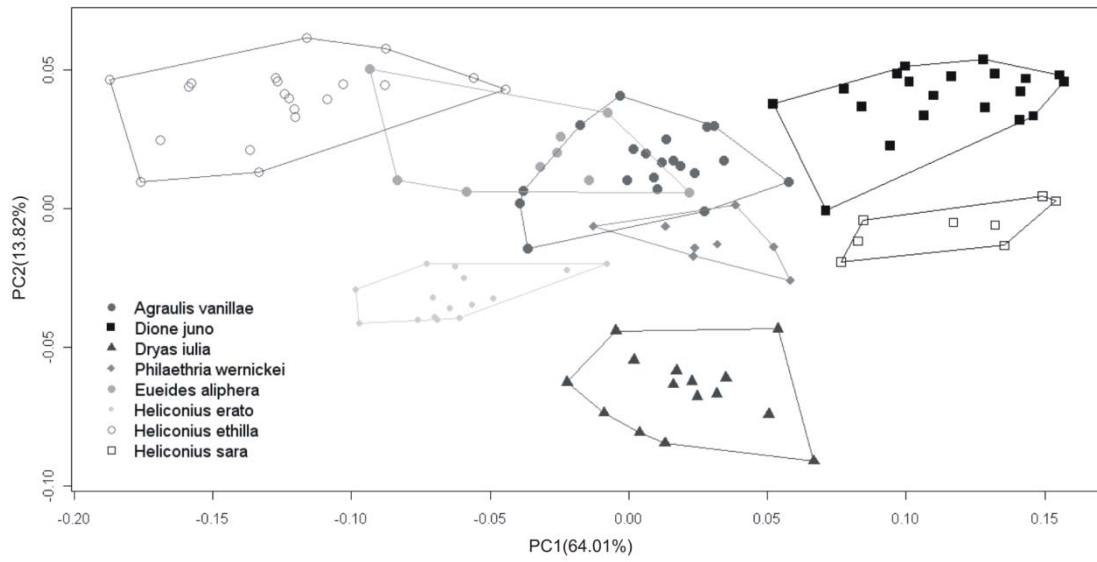


Figura 20. Continuação.

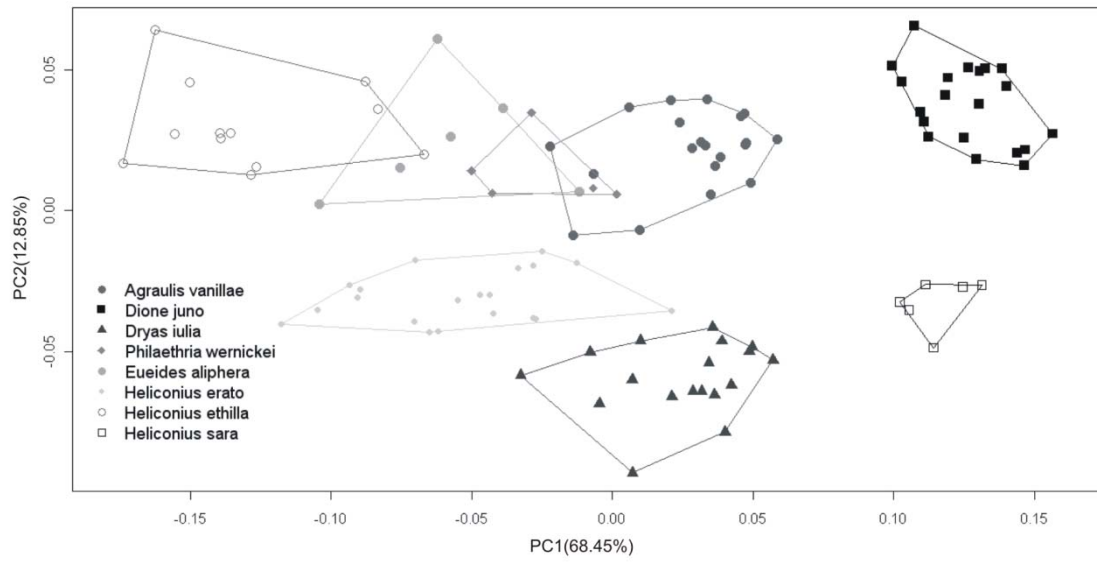
E

Figura 20. Continuação.

Tab.7. Distâncias de Mahalanobis entre as espécies para cada instar.

Instar	Espécies						
	AVM	DIA	DJJ	EAA	HEN	HEP	HSA
L1	DIA	119.6					
	DJJ	56.2	104.0				
	EAA	78.2	205.7	133.3			
	HEN	45.4	244.0	118.0	75.5		
	HEP	34.0	176.7	96.1	66.1	20.8	
	HSA	30.1	139.1	47.8	50.6	58.1	36.6
	PW	146.9	34.5	119.1	166.2	248.9	191.4
L2	DIA	162.9					
	DJJ	68.3	195.2				
	EAA	152.9	226.8	174.2			
	HEN	88.5	226.2	238.4	119.9		
	HEP	81.9	114.5	170.9	93.5	56.4	
	HSA	121.1	118.4	74.9	88.7	223.7	115.8
	PW	182.4	66.4	147.0	220.1	288.3	175.2

Tab.7. Continuação.

Instar	Espécies						
	AVM	DIA	DJJ	EAA	HEN	HEP	HSA
	DIA	88.7					
	DJJ	90.9	120.8				
	EAA	85.9	160.3	140.9			
L3	HEN	97.3	212.1	276.6	102.6		
	HEP	62.7	105.4	200.5	86.7	50.5	
	HSA	97.9	73.3	44.1	87.3	224.5	131.9
	PW	98.4	51.9	84.5	105.3	230.6	136.7
	DIA	91.4					
	DJJ	85.4	188.7				
	EAA	151.2	221.0	309.7			
L4	HEN	87.4	186.2	202.9	90.9		
	HEP	81.1	77.2	230.9	139.1	90.9	
	HSA	93.6	111.7	82.4	176.0	168.2	129.8
	PW	49.1	60.2	119.4	122.3	113.1	87.1

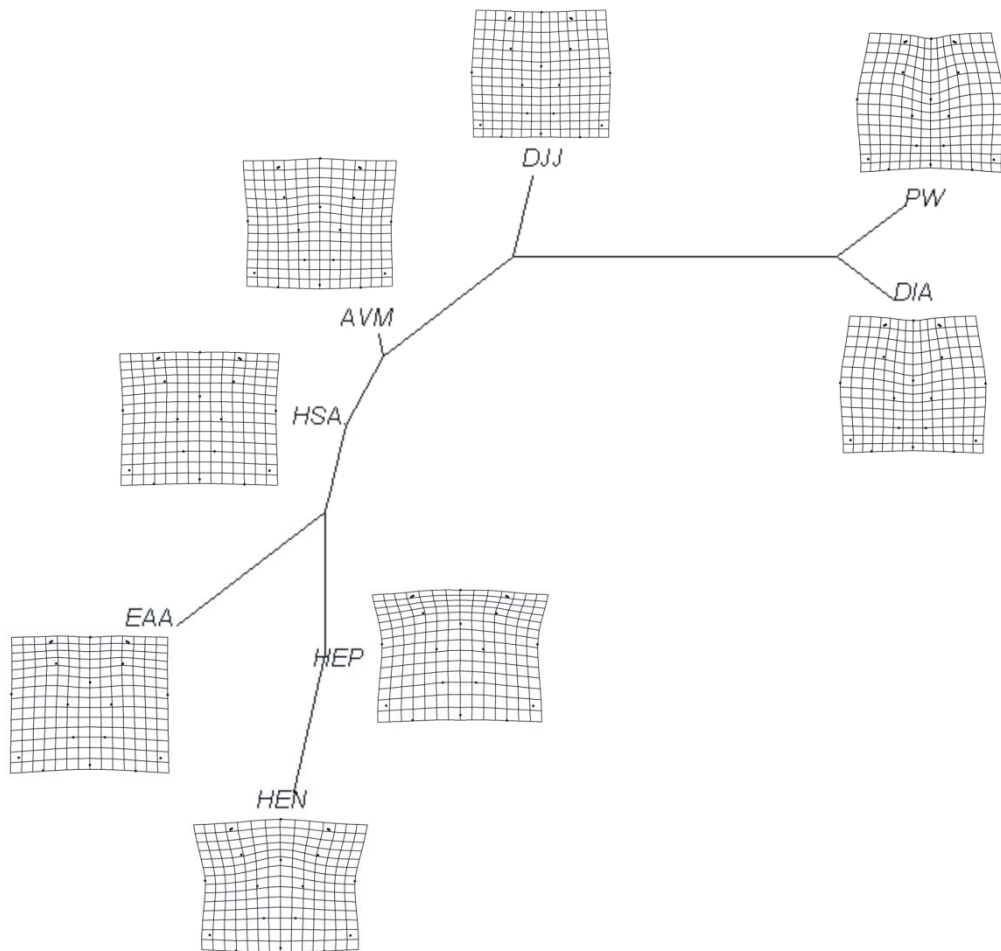
A

Figura 21 A-E. Árvores de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis para o primeiro (A), segundo (B), terceiro (C), quarto (D) e quinto instar (E).

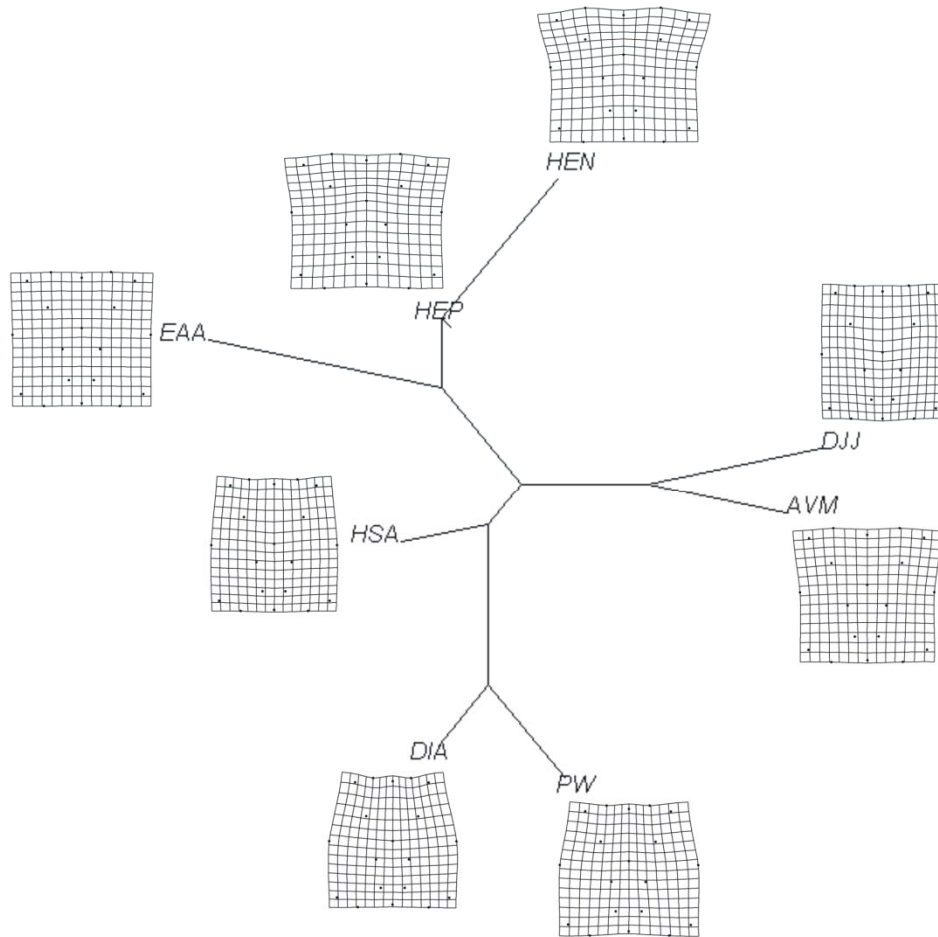
B

Figura 21. Continuação.

C

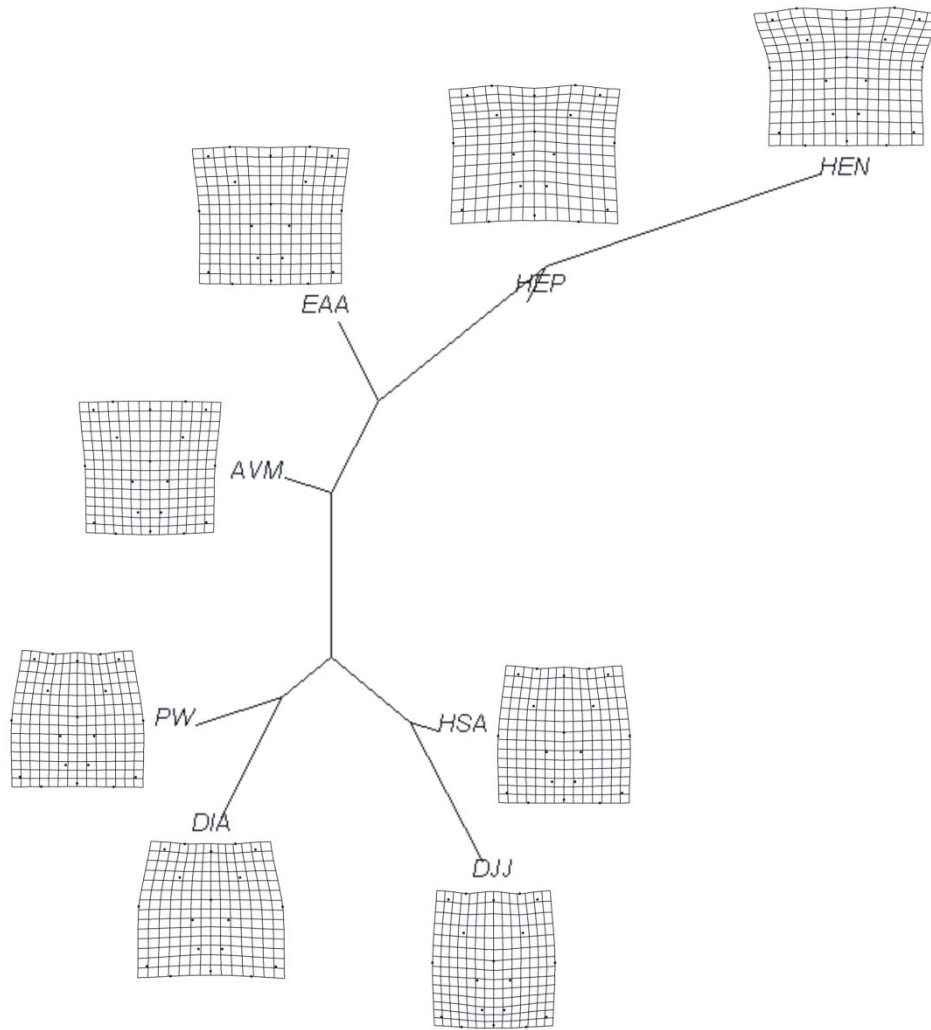


Figura 21. Continuação.

D

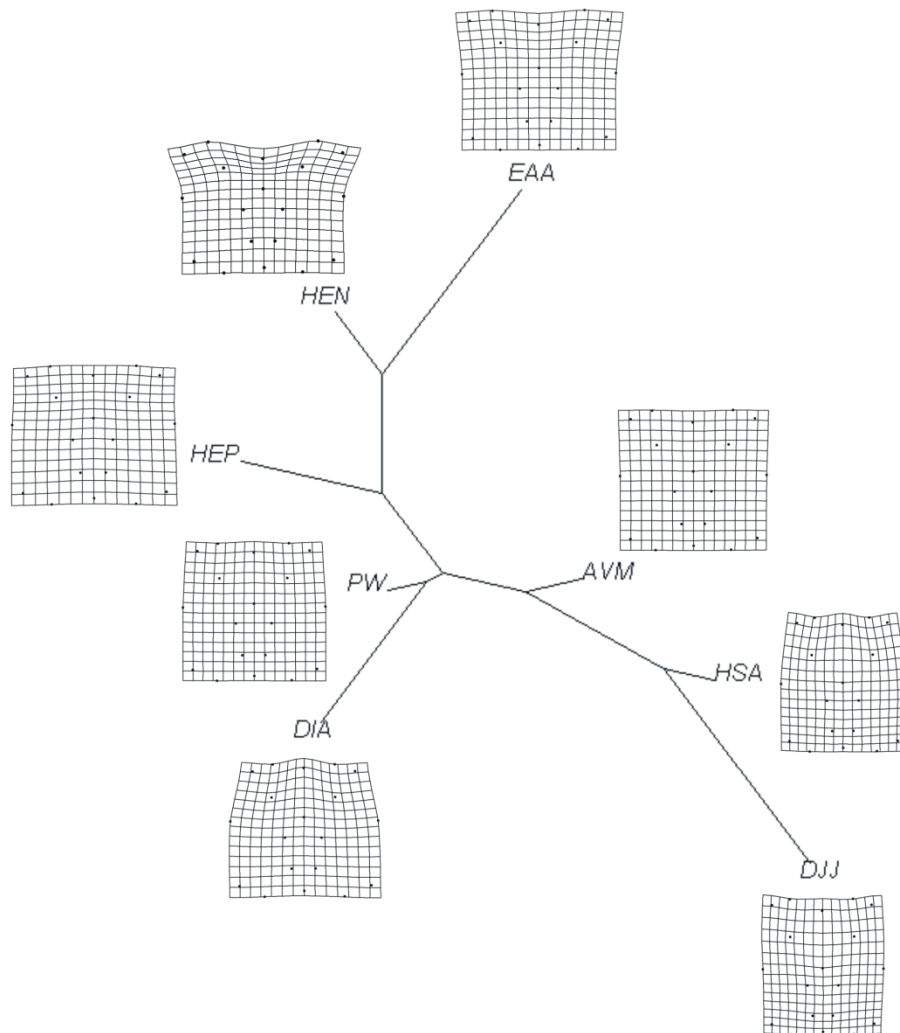


Figura 21. Continuação.

E

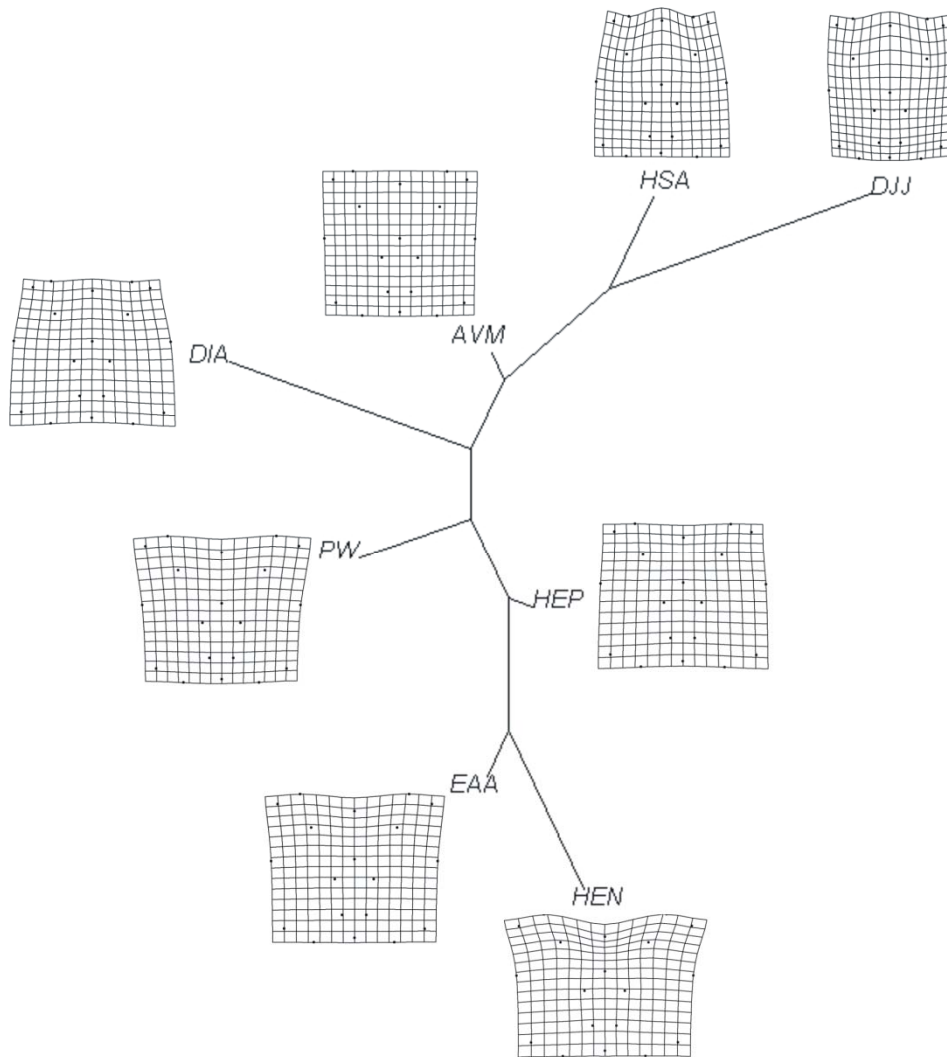


Figura 21. Continuação.

Tabela 8. Resultados das análises de correlação de Pearson entre a forma (PC1) e o tamanho do centróide, para as espécies dentro de cada instar.

Instar	t	correlação	valor p
I	7.2777	0.5308305	2.515e-11
II	7.2313	0.5446304	4.326e-11
III	8.8097	0.61739	8.438e-15
IV	4.7955	0.3968855	4.597e-06
V	1.3886	0.1284146	0.1676

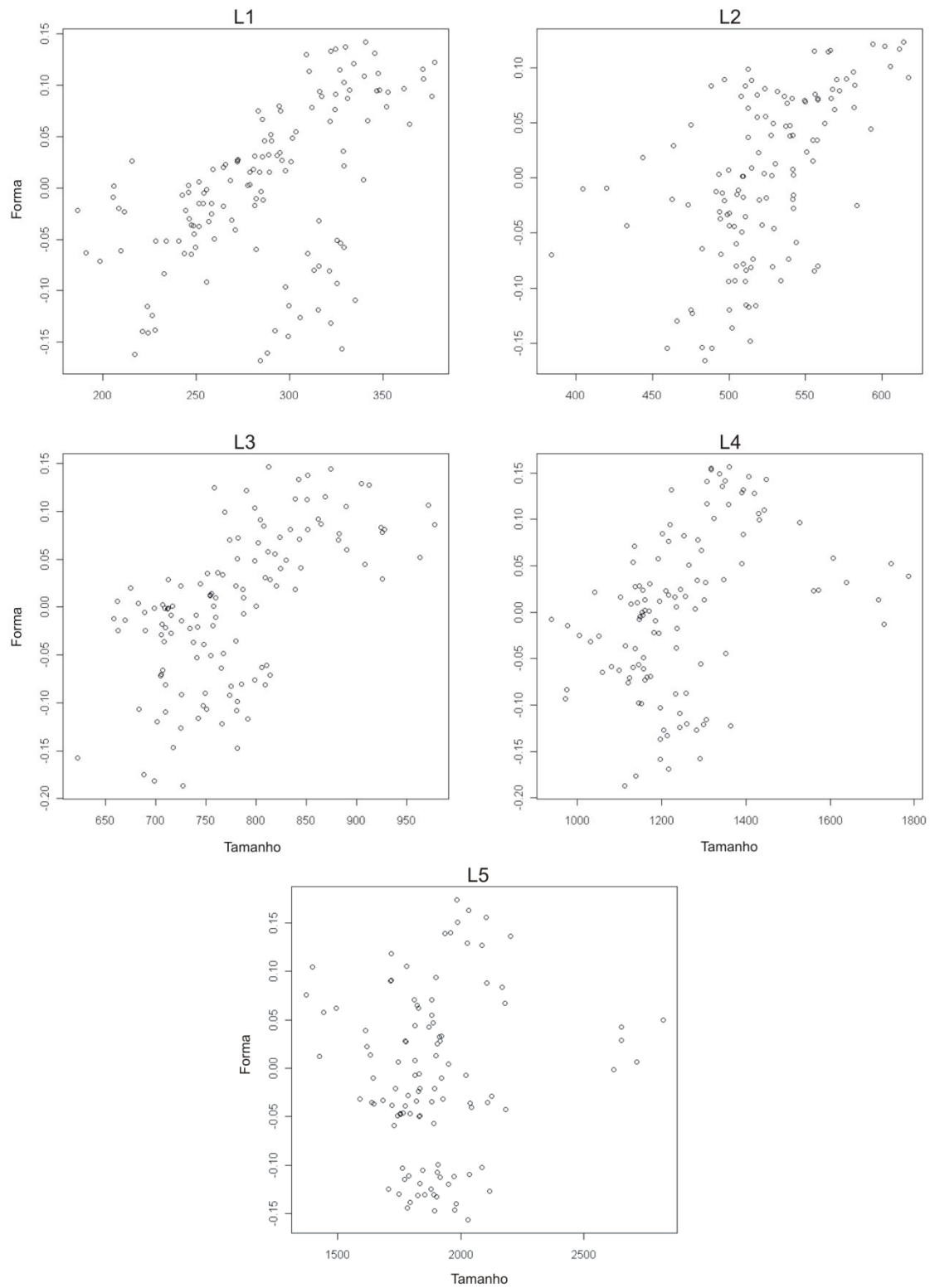


Figura 22. Correlações de Pearson entre a forma (PC1) e o tamanho do centróide para oito espécies de heliconíneos dentro de cada instar.

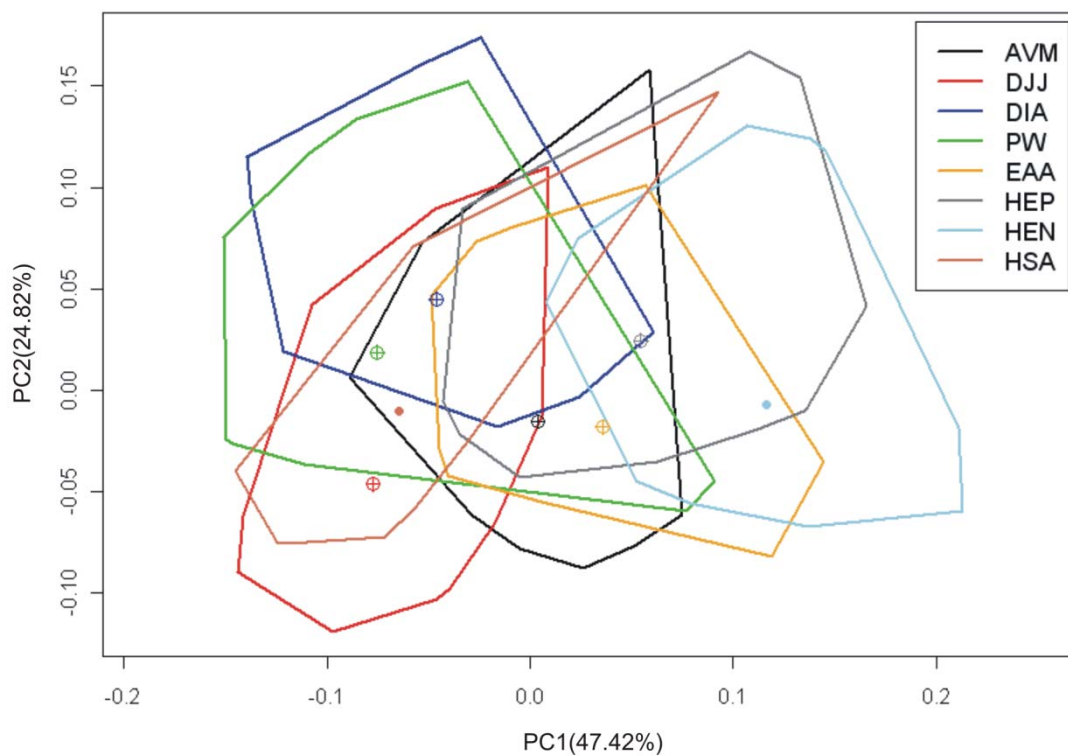
A

Figura 23 A-C. Ordenamento das espécies nos componentes 1 e 2 (A), 3 e 4 (B) e 5 e 6 (C) das análises de componentes principais, realizadas com os resíduos de sobreposição de Procrustes, para todos os instares. Entre parênteses as percentagens de variância explicadas por cada eixo.

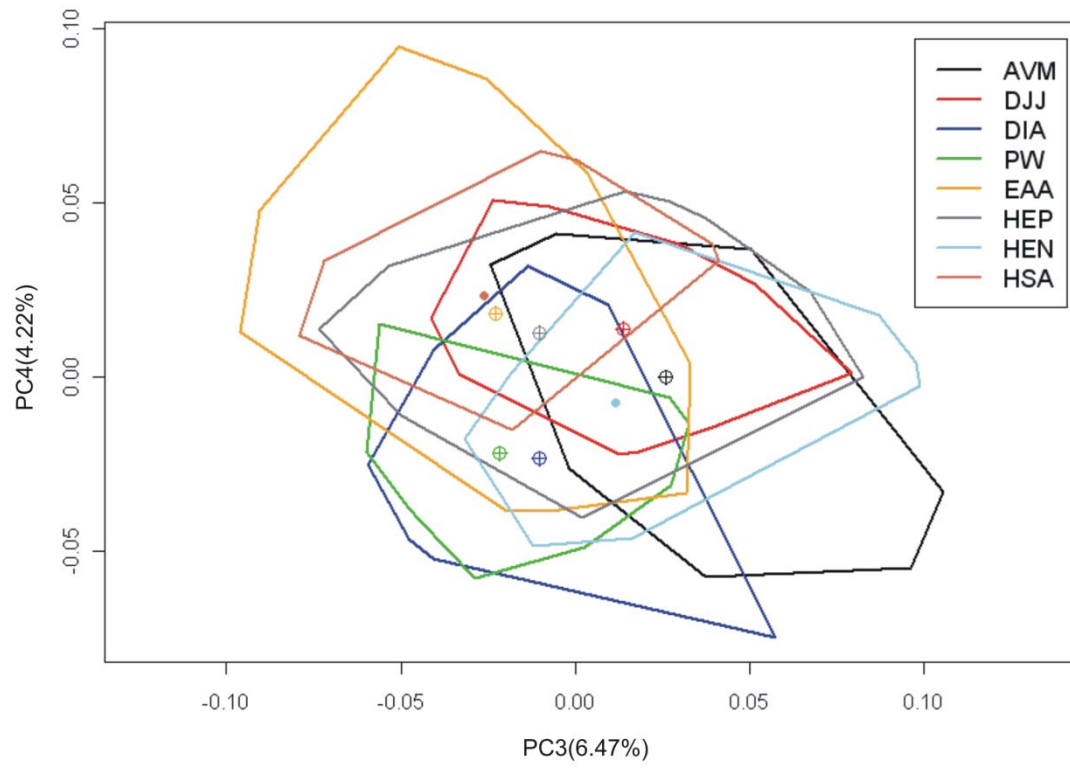
B

Figura 23. Continuação.

C

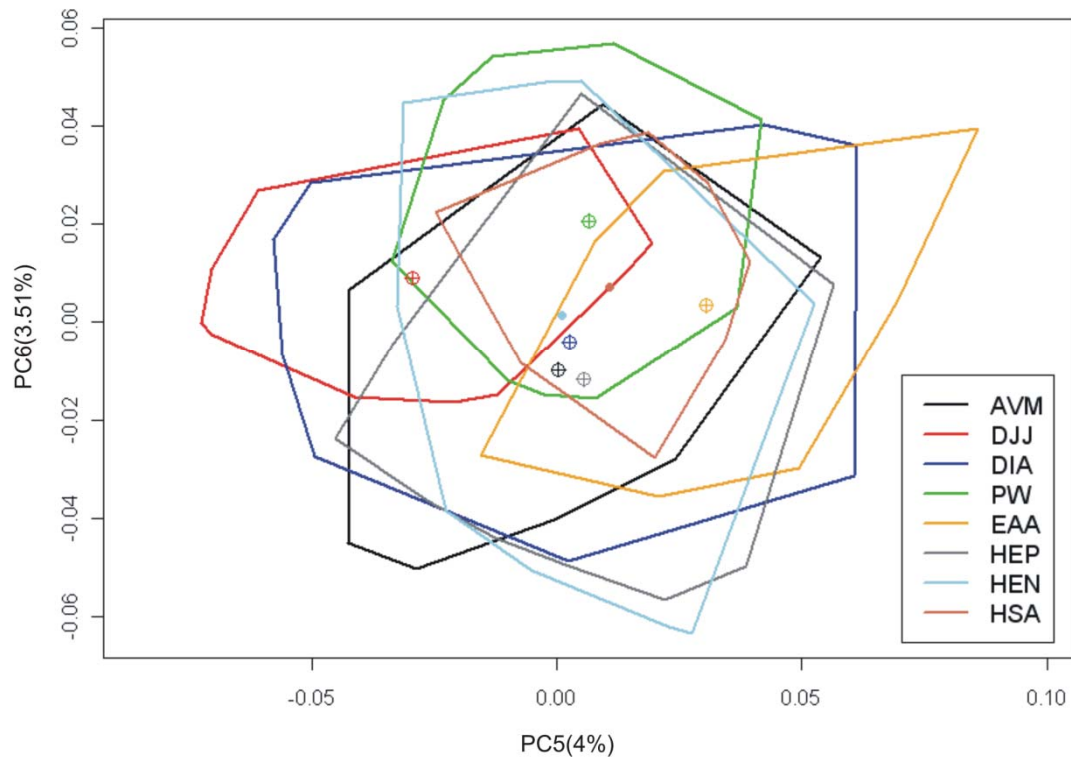


Figura 23. Continuação.

Tab.9. Distâncias de Mahalanobis entre as espécies para todos os instares.

	AVM	DIA	DJJ	EAA	HEN	HEP	HSA
DIA	19.4						
DJJ	24.0	44.8					
EAA	32.1	37.8	74.0				
HEN	22.2	30.3	74.3	22.9			
HEP	22.9	28.7	68.3	19.4	7.8		
HSA	19.2	19.7	25.7	25.6	37.3	25.6	
PW	31.5	14.9	48.0	38.1	48.7	43.6	25.6

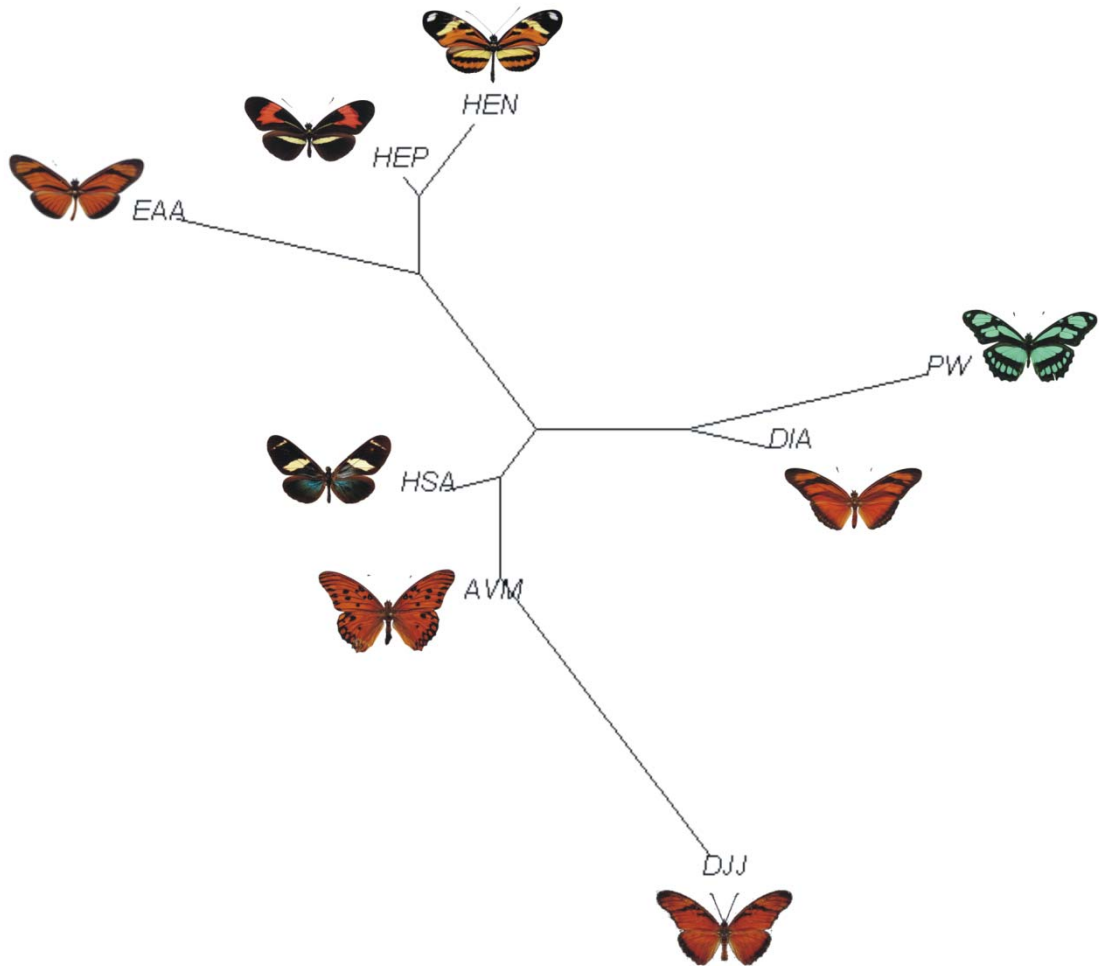


Figura 24. Árvore de Neighbor-Joining das distâncias de Mahalanobis entre as espécies, incluindo todos os instares.

Tabela 10. Estimativa de divergência entre oito seqüências de heliconíneos pareadas, utilizando o método de máxima composição de verossimilhança (distância de Tamura-Nei 1993).

	AVM	DIA	DJJ	EAA	HEN	HEP	HSA
DIA	112						
DJJ	96	105					
EAA	87	103	76				
HEN	91	114	84	73			
HEP	92	119	86	70	61		
HSA	93	104	87	92	97	91	
PW	81	92	80	76	88	85	82

A

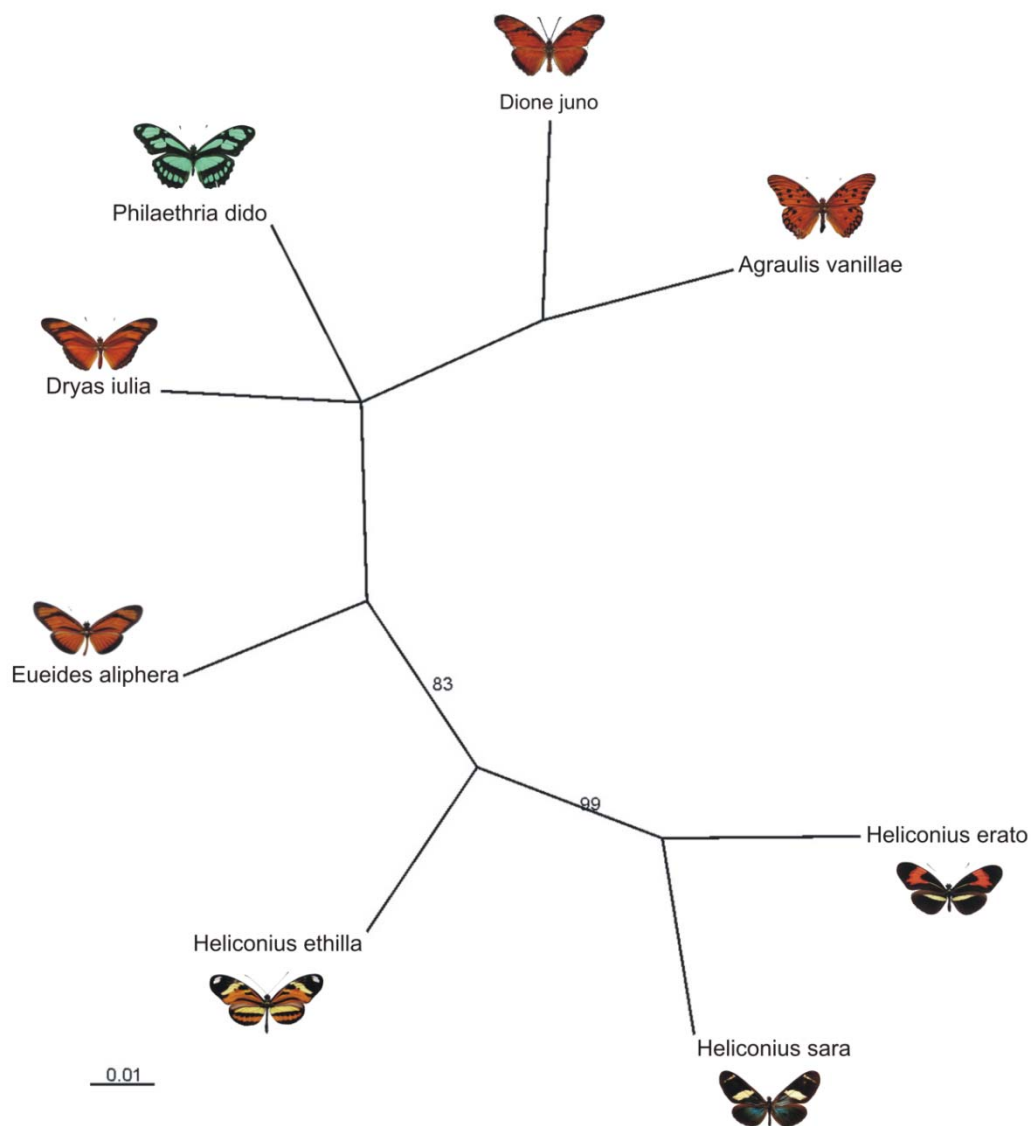


Figura 25 A-C. Árvores filogenéticas não-enraizadas para oito espécies de heliconíneos com base na análise combinada de dados de mtDNA (CO e 16S) e nuclear (EF-1 α , DPP, AP, e WG), totalizando 3.824 nucleotídeos. A, máxima verossimilhança; B, Neighbor-Joining; C, análise bayesiana. Os valores nos ramos em A e B indica o suporte de *bootstrap* para o nó equivalente, após 1000 replicações, e em C a probabilidade posterior.

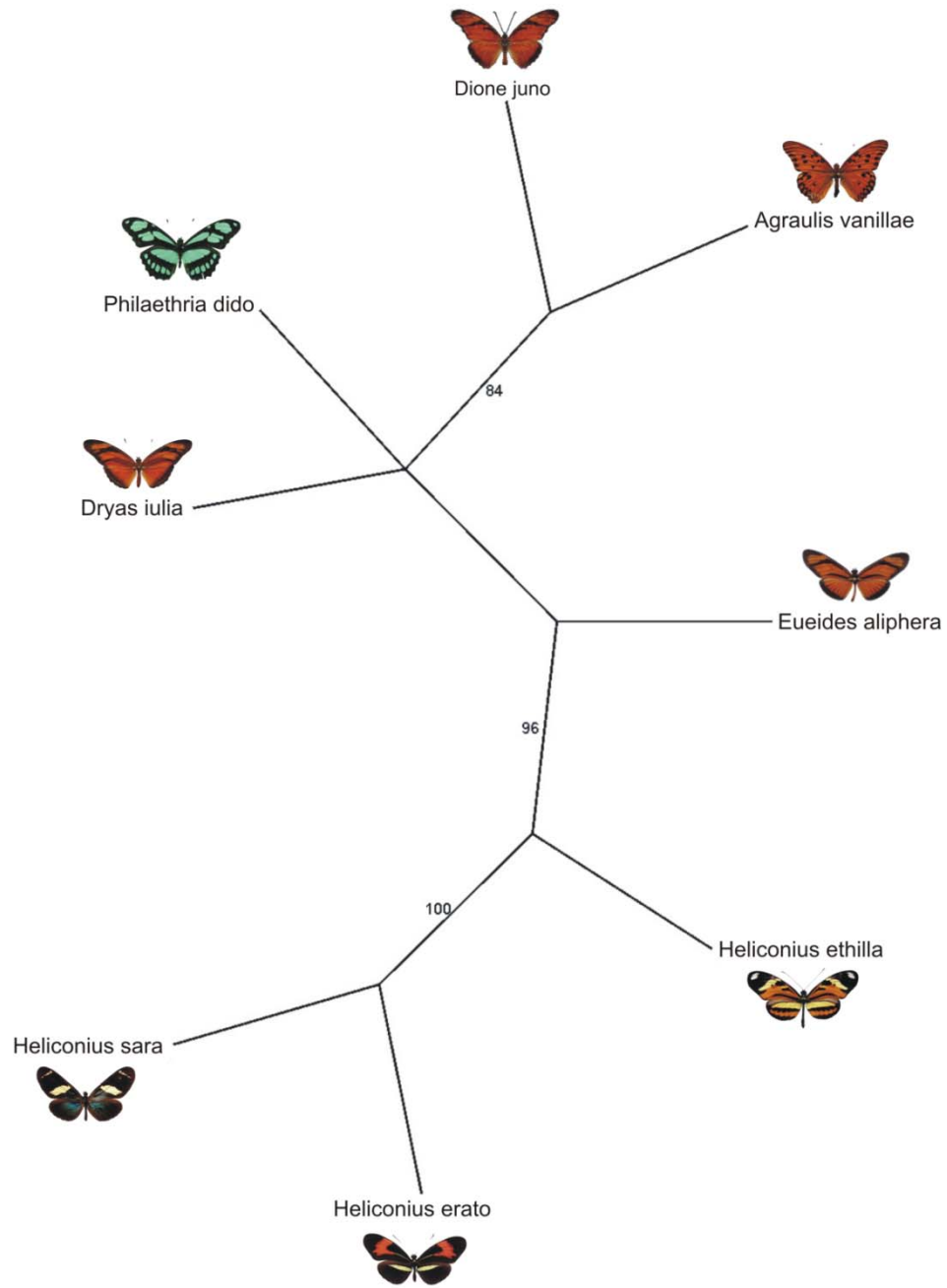
B

Figura 25. Continuação.

C

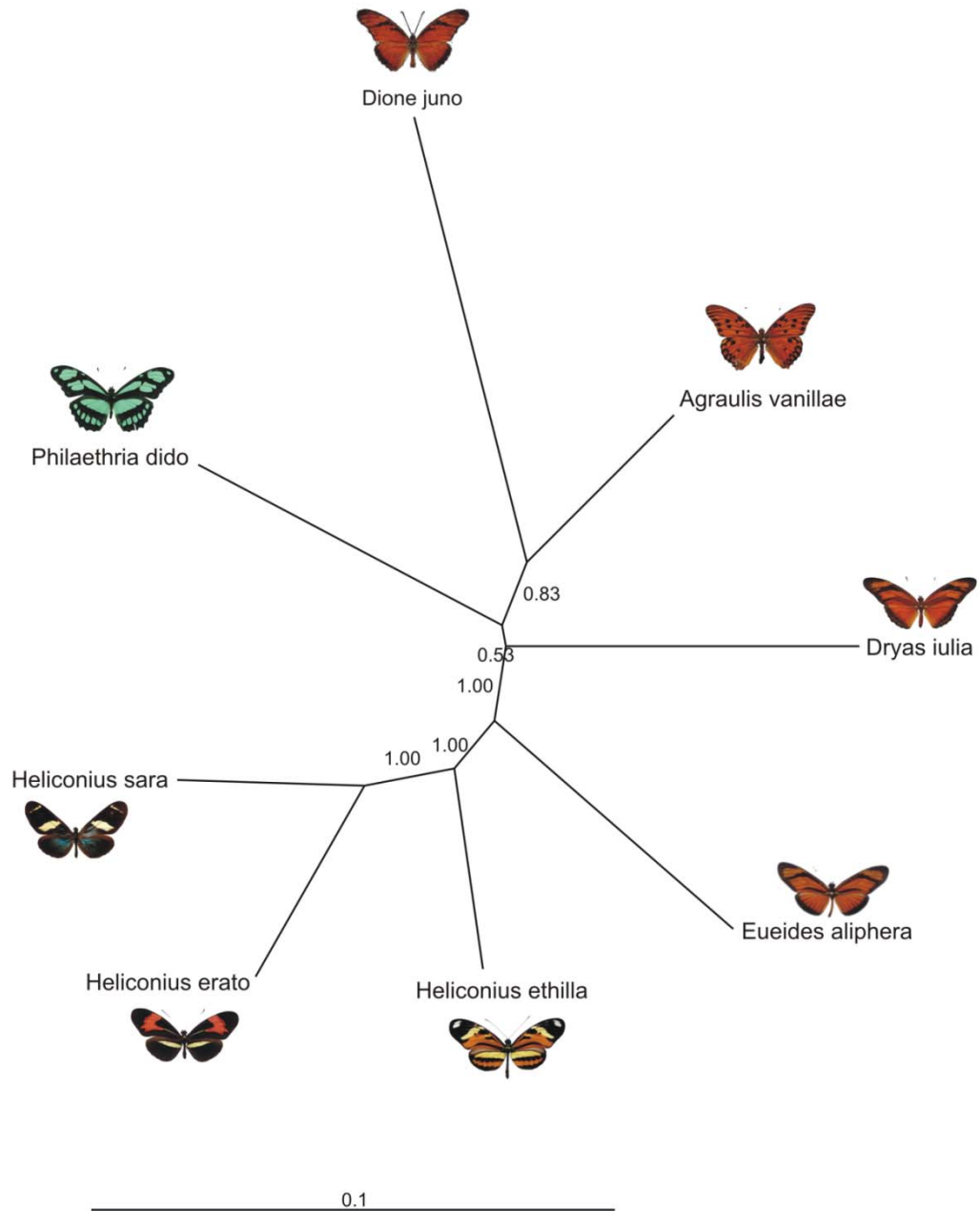


Figura 25. Continuação.

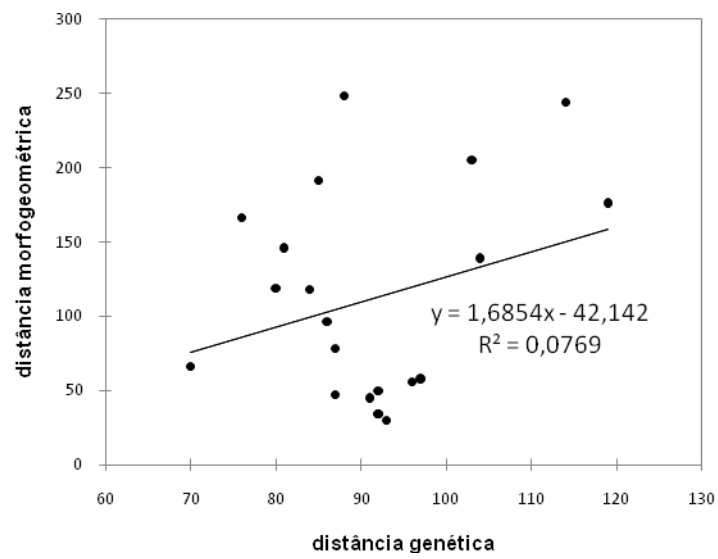
A

Figura 26 A-B. Correlações de Pearson entre a matriz de distancia genética (DG) *versus* distância de Mahalanobis utilizando o teste de Mantel. A, distancia L1 x DG; B, L5 x DG.

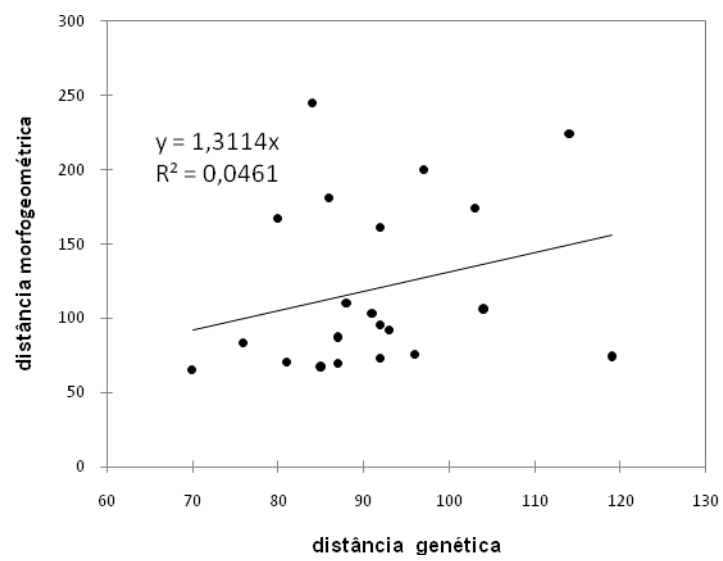
B

Figura 26. Continuação.

DISCUSSÃO

Os métodos de morfometria geométrica utilizados permitiram evidenciar que tanto em nível ontogenético quanto filogenético, todas as espécies de heliconíneos avaliadas sofrem variações na forma de suas cápsulas cefálicas.

Análises ontogenéticas

As análises de componentes principais juntamente com a função *thin plate splines* permitiram identificar que a principal diferença entre o primeiro instar e os demais se deve à constrição da região posterior da cápsula cefálica em L1, relativamente à crescente expansão ao longo do desenvolvimento nos demais instares. Sugerimos que essa diferença é devida ao crescimento interno do músculo adutor das mandíbulas, o qual origina-se principalmente na porção superior da cápsula cefálica e insere-se em um apódema conectado diretamente à base da mandíbula (Chapman 1998). A constrição observada no primeiro instar é responsável pela nítida separação deste em relação aos demais instares nas análises de componentes principais.

Bernays (1986) comparou o tamanho das cápsulas cefálicas e a área do apódema do músculo adutor das lagartas de *Pseudaletia unipuncta*, alimentadas com folhas tenras ou rígidas. Demonstrou que frente à ingestão de folhas rígidas, o músculo adutor tornou-se muito mais desenvolvido e, conseqüentemente, o tamanho das cápsulas cefálicas foi maior, em relação às larvas criadas com folhas tenras. O mesmo foi demonstrado por Bernays & Hamai (1987) para os ortópteros *Locusta migratoria* e *Chorthippus curtipennis*. Em ambos os gafanhotos, a largura da cabeça foi significativamente maior quando criados nas gramíneas de maior dureza (*Triticum* sp. para *L. migratoria* e *Poa* sp. para *C. curtipennis*).

Gorb & Beutel (2000) demonstraram que as diferenças na forma da região cefálica, entre três diferentes linhagens de coleópteros, podem ser atribuídas a requerimentos biomecânicos correlacionados às diferentes estratégias alimentares apresentadas por cada uma dessas linhagens.

Brannenn *et al.* (2005) inferiram que a alometria cefálica ao longo da ontogênese larval do coleóptero *Agabus desintegratus* é devida à variação estratégico-alimentar durante o seu desenvolvimento. Principalmente na região superior da cápsula cefálica é que se deram as maiores dilatações, provavelmente devidas ao crescimento exagerado do músculo adutor, em seus pontos de origem.

Assim, no contexto do presente trabalho, a região posterior da cápsula cefálica pode estar representando as maiores transformações no desenvolvimento da cabeça como um todo (incluindo o músculo adutor e demais órgãos cefálicos internos). E tal crescimento pode estar relacionado biomecanicamente não somente ao padrão alimentar das larvas, mas também ao crescente tempo empregado por estas na alimentação com o avanço da ontogênese (Alexander 1961) e, possivelmente, às crescentes taxas de ingestão e consumo.

A significância estatística das correlações de Pearson entre a forma e o tamanho ao longo da ontogênese indica que há alometria ontogenética para todas as espécies analisadas.

As variações observadas na forma das cápsulas cefálicas das espécies aqui analisadas não se deram, contudo, de forma linear. As distâncias morfométricas (distâncias de Mahalanobis) entre os instares não foram crescentes ao longo da ontogênese. Isto sugere que a forma da cápsula cefálica em Heliconiini não é modulada apenas por fatores deterministicamente ontogenéticos. Possivelmente, ao

longo da ontogênese há imposição de diferentes pressões seletivas, ou diferentes respostas a uma pressão seletiva constante. A forma dos instares, portanto, é resultado de um complexo de pressões seletivas interagentes e processos de desenvolvimento, os quais podem estar sujeitos a restrições evolutivas e desenvolvimentais que não permitam grandes modificações.

No contexto do presente trabalho, desconhecem-se as pressões seletivas responsáveis pela não-linearidade no desenvolvimento ontogenético da forma da cápsula cefálica. Se fossem levadas em conta apenas as pressões impostas pelas plantas hospedeiras, poder-se-ia então inferir que a forma é definida por diferentes respostas das larvas frente à ingestão destas hospedeiras.

Em relação aos padrões ontogenéticos de alimentação, por exemplo, no gênero *Heliconius* as larvas iniciam o desenvolvimento alimentando-se em folhas tenras e avança para folhas maduras conforme a ontogênese (Rodrigues & Moreira 1999). Porém, para grande parte dos gêneros de cladogênese mais antiga, consomem folhas maduras ao longo de toda a ontogênese. Em adição, resta futuramente analisar as variações ontogenéticas na forma das mandíbulas, as quais são consideráveis, conforme avaliações preliminares efetuadas (G.R.P. Moreira, UFRGS, dados inéditos).

Análises filogenéticas

As análises de componentes principais para as comparações interespecíficas mostraram uma relação descontínua entre as espécies nos diferentes instares, sendo que a proximidade morfométrica entre as espécies parece envolver uma mistura complexa de fatores filogenéticos e ecológicos. Assim, as incongruências entre a

variação na forma da região cefálica e a filogenia molecular de Beltrán *et al.* (2007) podem ser devidas a convergências adaptativas associadas a aspectos biomecânicos, relacionados ao hábito alimentar e grau de sociabilidade das espécies.

Em relação à gregariedade, as larvas de *D. juno* nos instares iniciais se alimentam em grupos que podem variar de 60 a 140 larvas, e em *H. sara* podem ser encontradas até 200 larvas (Brown 1981). O fato dessas espécies manterem-se boa parte do estágio larval (basicamente nos instares iniciais, a partir do quarto instar passam a se desagregar) dispostas lateralmente entre si, pode ter contribuído para a realocação do crescimento principalmente em altura, em detrimento do crescimento lateral. Porém, como o comportamento (representado pelo hábito gregário) modula o desenvolvimento para estabelecer a arquitetura da forma da cápsula cefálica, ainda desconhecem-se as razões correspondentes. No caso de *H. sara*, é evidente a existência de restrição ecológica para a evolução da forma da cápsula cefálica no gênero *Heliconius*, considerando que a mesma se aproxima daquela de *D. juno*, pertencente à cladogênese mais antiga.

No caso de *H. sara*, a hipótese de uma possível estase – manutenção de uma forma ancestral (representada por *D. juno*), pode ser descartada, uma vez que o hábito gregário, conforme Beltrán *et al.* (2007), evoluiu independente pelo menos três vezes. O hábito gregário em Heliconiini está presente nos gêneros *Dione*, *Eueides*, *Heliconius*, *Laparus* e *Neruda* (sendo que os três últimos são parafiléticos).

Contrariamente, *E. alipha* e *H. ethilla*, que apresentam hábito solitário, investem proporcionalmente mais em largura, investindo seu crescimento em direções laterais.

A forma de *A. vanillae* (espécie de cladogênese mais antiga e padrão alimentar generalista) em boa parte assemelhou-se a *H. sara*. Podemos observar que a forma de *A. vanillae* ao longo dos instares, e comparativamente às demais espécies, aparenta ser uma forma consenso entre as demais espécies, uma vez que, em termos de proporção, não investe nem muito em altura nem muito largura. O mesmo foi constatado para *H. erato*.

P. wernickei e *D. iulia* apresentaram como peculiaridade as baixas distâncias entre as cerdas P2 ou escolos, evidenciando o aspecto de que sua região anterior é relativamente mais larga. Isto talvez possa ser respondido através do estudo alométrico das mandíbulas em relação à cápsula cefálica. Ambas espécies alimentam-se sobre folhas velhas, já a partir do primeiro instar (Brown 1981). Então, será que essas espécies investem mais no desenvolvimento das mandíbulas em si, e por isso reduzem a realocação de energia que poderia ser destinada ao desenvolvimento do músculo adutor em seus pontos de origem na região posterior? Será que o músculo adutor nessas espécies origina-se principalmente em pontos laterais, o que poderia influenciar a dinâmica anatômica de seus aspectos biomecânicos? A largura anterior da cápsula cefálica pode ser reflexo, nesse caso, do tamanho das mandíbulas, entretanto, esse aspecto resta ser avaliado. Esse padrão de forma, observada no presente estudo apenas para essas duas espécies, pode ser classificada filogeneticamente como ancestral. Dentro de um contexto desenvolvimental, a arquitetura dessa forma pode ser moldada por meio de competição entre as diferentes regiões topológicas da cápsula cefálica. Diante da ingestão de folhas velhas, talvez a primeira modificação alométrica tenha se dado no investimento relativamente maior em tamanho (e forma?) de mandíbulas. O deslocamento de energia e nutrientes para

o desenvolvimento destas, talvez tenha “suprimido” o crescimento em largura da região posterior. A partir do quarto instar *P. wernickei* inicia um processo de divergência de sua forma comum com *D. iulia*. Isso foi devido ao crescente distanciamento entre seus escolos (provavelmente consequência do crescimento acentuado do músculo adutor no espaço entre os escolos). Não podemos, porém, analisar isoladamente a significância biomecânica do músculo adutor. Apesar de ser imprescindível o papel biológico deste para a ingestão, a sua relação alométrica com as mandíbulas também deve ser futuramente avaliada.

Por fim, cabe levantar o fato de que, contrariamente ao hábito gregário que evoluiu pelo menos três vezes independentemente, os padrões alimentares ao que tudo indica são bem estabelecidos filogeneticamente. Isto é, em se tratando das espécies de cladogênese mais antiga (aqui estudadas), *A. vanillae* apresenta comportamento generalista – alimentam-se indiscriminadamente tanto de folhas jovens quanto de velhas nos instares iniciais, já *D. iulia* e *P. wernickei* alimentam-se exclusivamente de folhas velhas. O gênero *Eueides* aparenta ser o elo na evolução dos padrões alimentares de Heliconiini, uma vez que é representado por espécies que se alimentam ou de folhas velhas ou de folhas jovens. *E. aliphera* alimenta-se, nos instares iniciais, preferencialmente na face abaxial de folhas jovens (Périco 1995, Dell’Erba *et al.* 2005). O gênero *Heliconius*, por sua vez, é representado inteiramente por espécies que iniciam seu desenvolvimento em folhas jovens (Brown 1981). Portanto, os padrões alimentares generalistas e aquele apresentado pelas demais espécies que primeiro divergiram (alimentação de folhas velhas) não evoluíram novamente, de modo que se desconhece uma espécie de *Heliconius* que se alimente naturalmente de folhas velhas, nos instares iniciais. Benson (1978) propôs que a

evolução dos padrões alimentares de Heliconiini poderia estar associada à partição de recursos.

Em relação ao hábito gregário, Sillén-Tullberg (1988) propôs que este surgiu posteriormente à evolução da impalatibilidade, uma vez que a gregariedade é desvantajosa para organismos palatáveis que vivem em habitats expostos.

A significância das correlações de Pearson para os instares 1 a 4 indica que, para estes, há alometria filogenética, enquanto que para o quinto instar não.

Em relação às variações interespecíficas nos padrões ontogenéticos de alimentação, resta futuramente analisar as variações filogenéticas na forma das mandíbulas.

As análises de componentes principais referentes à análise interespecífica geral mostraram quase nula diferenciação entre as espécies, devido à inclusão dos resíduos de sobreposição de todos os instares e espécies.

A topologia da árvore de Neighbor-Joining mostrou o gênero *Eueides* inserido entre os ramos do gênero *Heliconius*. *H. sara*, porém, muito próxima de *A. vanillae*; e *D. juno*, relativamente apresentou a maior distância entre as demais espécies. *P. wernickei* e *D. iulia* mostraram-se próximas, sobretudo devido à semelhança dos seus padrões de forma dos instares 1 a 4.

Do ponto de vista topológico, os testes de Mantel demonstraram que as árvores morfométricas de Neighbor-Joining, com base na forma da cápsula cefálica, não se relacionaram significativamente às árvores filogenéticas, morfológicas e/ou moleculares, de Heliconiini (Lee *et al.* 1992, Brower 1994, Brower & Egan 1997, Penz 1999, Beltrán *et al.* 2007).

A forma da cápsula cefálica demonstra estar sob influência de fatores ecológicos e comportamentais associados à sociabilidade larval. Em termos morfogeométricos, as espécies de hábito gregário aqui estudadas (*D. juno* e *H. sara*), a despeito de sua alta distância filogenética (Beltrán *et al.* 2007), apresentaram estreita relação de proximidade fenotípica, com base na morfometria geométrica da cápsula cefálica. Principalmente *H. sara* contribuiu para a incongruência topológica entre as árvores morfométricas e a filogenética de Beltrán *et al.* (2007), sobretudo devido ao seu distanciamento, com base na morfometria geométrica, de *H. erato* e *H. ethilla* e a sua aproximação de *D. juno*, que por sua vez, mantém-se próxima de *A. vanillae*.

Pode-se inferir, portanto, que a forma da cápsula cefálica, somente em parte, está relacionada a fatores filogenéticos. Devido a restrições impostas pelo hábito social, as espécies gregárias apresentam convergência na forma de suas cápsulas cefálicas. Ou seja, a expressão fenotípica na forma das cápsulas cefálicas de Heliconiini, por uma pressão seletiva associada ao hábito gregário, não se correlaciona integralmente às filogenias moleculares de Heliconiini. Desse modo, este critério não pode ser utilizado como um caractere discreto em análises de filogenia, pois não é influenciada por esta na sua integridade.

Entretanto, uma vez que também é influenciada por fatores ecológicos e comportamentais, a forma da cápsula cefálica pode ser empregada à melhor compreensão das paisagens adaptativas e fenotípicas desenvolvimentais, principalmente associadas às restrições ecológicas e filogenéticas atuantes no desenvolvimento larval de Heliconiini.

Perspectivas

Para o desenvolvimento completo deste trabalho, pretendemos incluir mais espécies, principalmente dentro do espectro de variação dos hábitos alimentares e sociais. Pretendemos incluir outras espécies de hábitos semi-gregário e gregário, representantes dos gêneros *Dione*, *Eueides*, *Heliconius*, *Neruda* e *Laparus*. Salienta-se ainda que os três últimos são parafiléticos (Beltrán *et al.* 2007), e que dois destes não foram contemplados no presente estudo, assim como *Podotricha* (de hábito solitário).

É crescente o número de trabalhos com enfoque evolutivo desenvolvimental (Brakefield 2006, Nijhout 2008). A ausência de correlação entre algoritmos genéticos e morfológicos tem cada vez mais despertado interesse aos limites compreendidos entre o genótipo e o fenótipo. As relações genótipo-fenótipo são ainda pouco conhecidas, sendo apenas evidente que entre esses dois níveis atua um complexo multidimensional de fatores interagentes, mecanismos epigenéticos, variáveis ambientais e módulos desenvolvimentais (Wolf 2002). Devido à limitação experimental para o estudo das interações multifatoriais do desenvolvimento, essa abordagem é tratada por enquanto apenas em modelos teóricos e matemáticos (Wolf 2002, Wu & Hou 2006, Nijhout 2008).

Nijhout (2008) conceituou essa abordagem dentro de um modelo multidimensional de paisagens fenotípicas desenvolvimentais, cujas superfícies definem o desenvolvimento do fenótipo associado às múltiplas combinações de fatores influentes. O número de fatores contribuintes para a variação fenotípica define o número de dimensões do espaço em que uma determinada paisagem existe. Teoricamente, se não houvesse limitações quanto à utilização dos inúmeros fatores responsáveis pela expressão de um traço fenotípico qualquer (p.ex. a forma), as

paisagens correspondentes seriam analisadas em um espaço multidimensional (i.e., em um hiperespaço).

Dentro do contexto do presente trabalho, identificar as causas e conseqüências da não-linearidade observada entre a forma da cápsula cefálica e aspectos da filogenia é importante para compreender como a variação ontogenética da forma pode ser adaptada à abordagem evolutiva da biologia desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.C. & D.J. FUNK. 1997. Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neochlamisus bebbiana*e leaf beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. **Systematic Biology**, Washington, **46**: 180-194.
- ADAMS, D.C. & M.S. ROSENBERG. 1998. Partial warps, phylogeny, and ontogeny: a comment on Fink and Zelditch (1995). **Systematic Biology**, Washington, **47**: 168-173.
- ALBERCH, P. 1980. Ontogenesis and morphological diversification. **American Zoology**, New York, **20**: 653-667.
- ALBERCH, P.; S.J. GOULD; G.F. OSTER & D.B. WAKE. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. **Paleobiology**, New York, **5**: 296-317.
- ALEXANDER, A.J. 1961. A study of the biology and behavior of the caterpillars, pupae and emerging butterflies of the subfamily Heliconiinae in Trinidad, West Indies. Part I. Some aspects of larval behavior. **Zoologica**, New York, **45**:1-25.
- ATCHLEY, W.R. 1991. A model for development and evolution of complex morphological structures. **Biological Reviews**, Cambridge, **66**: 101-157.
- ATKINSON, J.W. 1992. Conceptual issues in the reunion of development and evolution. **Synthese**, Dordrecht, **91**: 93-110.
- BAINES, R.A.; N.M. TYRER & R.G.H. DOWNER. 1990. Serotonergic innervation of the locust mandibular closer muscle modulates contractions through the elevation of cyclic adenosine monophosphate. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, **294**: 623-632.

- BELDADE, P.; K. KOOPS & P.M. BRAKEFIELD. 2002. Developmental constraints versus flexibility in morphological evolution. **Nature**, London, **416**: 844-847.
- BELTRÁN, M.; C.D. JIGGINS; A.V.Z. BROWER; E. BERMINGHAM; J. MALLETT. 2007. Do pollen feeding, pupal-mating and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, **92**: 221–239.
- BENSON, W.W. 1978. Resource partitioning in passion vine butterflies. **Evolution**, Bolder, **32**: 493-518.
- BENSON, W.W.; K.S. BROWN JR. & L.E. GILBERT. 1976. Coevolution of plants and herbivores: passion flowers butterflies. **Evolution**, Bolder, **29**: 659-680.
- BERNAYS, E.A. 1986. Diet-induced head allometry among foliag-chewing insects and its importance for graminivores. **Science**, Washington, **231**: 495-497.
- BERNAYS, E.A. 1991. Evolution of insect morphology in relation to plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, **333**: 257-264.
- BERNAYS, E.A. & J. HAMAI. 1987. Head size and shape in relation to grass feeding in Acridoidea (Orthoptera). **Journal of Insect Morphology & Embryology**, Oxford, **16**: 323-330.
- BIANCHI, V. & G.R.P. MOREIRA. 2005. Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, **22**: 43-50.
- BOOKSTEIN, F.L. 1991. **Morphometrics tools for landmark data: geometry and biology**. Cambridge University Press, New York. 435p.
- BOOKSTEIN, F.L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. **Bulletin of Mathematical Biology**, Elmsford, **58**: 313-365.

- BORGES, S.S. 2005. **Padrão natural, preferência alimentar e performance das larvas de *Dryas iulia alcionea* (Lep.: Nymphalidae) em relação à idade da folha de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae).** Dissertação de Bacharelado em Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre.
- BRAKEFIELD, P.M. 2006. Evo-devo and constraints on selection. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, **21**: 362-368.
- BRANNEN, D.; E.H. BARMAN & W.P. WALL. 2005. An allometric analysis of ontogenetic changes (variation) in the cranial morphology of larvae of *Agabus disintegratus* (Crotch) (Coleoptera: Dytiscidae). **The Coleopterists Bulletin**, Washington, **59**: 351-360.
- BROWER, A.V.Z. 1994. Phylogeny of *Heliconius* butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Bolder, **3**: 159–174.
- BROWER, A.V.Z. 1997. The evolution of ecologically important characters in *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a cladistic review. **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, **119**: 457–472.
- BROWER, A.V.Z. & M.G. EGAN. 1997. Cladistic analysis of *Heliconius* butterflies and relatives (Nymphalidae: Heliconiiti): a revised phylogenetic position for *Eueides* based on sequences from mtDNA and a nuclear gene. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, London, **264**: 969–977.
- BROWN JR., K.S. 1967. Chemotaxonomy and chemomimicry: the case of 3-hydroxykynurenine. **Systematic Zoology**, Washington, **16**: 213–216.
- BROWN JR., K.S. 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. **Annual Review of Entomology**, Stanford, **26**: 427-456.

- BROWN JR., K.S. & O.H.H. MIELKE. 1972. The heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe. **Zoologica**, New York, **57**: 1–40.
- BRUNER, E. & G. MANZI. 2001. Allometric analysis of the skull in Pan and Gorilla by geometric morphometrics. **Revista di Antropologia**, Roma, **79**: 45-52.
- CARDINI, A. 2003. The geometry of the marmot (Rodentia: Sciuridae) mandible: phylogeny and patterns of morphological evolution. **Systematic Biology**, Washington, **52**: 186-205.
- CHAPMAN, R.F. 1998. **The insects: structure and function**. Harvard University Press, Cambridge. 919p.
- CHEVERUD, J.M. 1982. Relationships among ontogenetic, static and evolutionary allometry. **American Journal of Physical Anthropology**, Washington, **59**: 139-149.
- DAS, G.M. 1937. The musculature of the mouth-parts of insect larvae. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, London, **80**: 39-80.
- DELL'ERBA, R.; L.A. KAMINSKI & G.R.P. MOREIRA. 2005. O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, **95**: 29-46.
- DRYDEN, I. & K.V. MARDIA. 1998. **Statistical shape analysis**. John Wiley & Sons, New York. XVII+347p.
- EMLEN, D. J. 1996. Artificial selection on horn length-body size allometry in the horned beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Evolution**, Bolder, **50**: 1219-1230.

- EMLÉN, D.J. 1997. Diet alters male horn allometry in the beetle *Ontophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabeidae). **Proceedings of the Royal Society of London**, London, **264**: 567-574.
- EMSLEY, M. 1963. A morphological study of imagine Heliconiinae (Lep.: Nymphalidae) with a consideration of the evolutionary relationships within the group. **Zoologica**, New York, **48**: 85–130.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Bolder, **39**: 783–791.
- FERRO, V.G. 1998. **Criação de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) em condições semi-naturais**. Dissertação de Bacharelado em Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre. 49p.
- FINK, W.L. 1982. The conceptual relationship between ontogeny and phylogeny. **Paleobiology**, New York, **8**: 254-264.
- FINK, W.L. & M. L. ZELDITCH. 1995. Phylogenetic analysis of ontogenetic shape transformations: A reassessment of the piranha genus *Pygocentrus* (Teleostei). **Systematic Biology**, Washington, **44**: 343-360.
- FLEMING, H. 1960. The first instar larvae of the Heliconiinae (Butterflies) of Trinidad, W.I. **Zoologica**, New York, **45**: 91-110.
- FRANKINO, W.A.; B.J. ZWAAN; D.L. STERN & P.M. BRAKEFIELD. 2005. Natural selection and developmental constraints in the evolution of allometries. **Science**, Washington, **307**: 718-720.
- FRANKINO, W.A.; B.J. ZWAAN; D.L. STERN & P.M. BRAKEFIELD. 2007. Internal and external constraints in the evolution of morphological allometries in a butterfly. **Evolution**, Bolder, **61**: 2958-2970.

- FUTUYMA, D.J. 2000. Some current approaches to the evolution of plant-herbivore interactions. **Plant Species Biology**, Kyoto, **15**: 1-9.
- GAYON, J. 2000. History of the concept of allometry. **American Zoology**, New York, **40**: 748-758.
- GILBERT, L.E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants, p. 210-240. *In*: L.E. GILBERT & P.H. RAVEN (Eds). **Coevolution of animals and plants**. The University of Texas, Austin. XIII+246p.
- GILBERT, L.E. 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern, process, and problems, p. 403-427. *In*: P.W. PRICE; T.M. RAVEN (Eds). **Plant animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions**. John Wiley & Sons, New York. 639p.
- GILBERT, S.F.; J.M. OPTIZ & R.A. RAFF. 1996. Resynthesizing evolutionary and developmental biology. **Developmental Biology**, San Diego, **173**: 357-372.
- GORB, S. & R.G. BEUTEL. 2000. Head-capsule design and mandible control in beetle larvae: a three-dimensional approach. **Journal of Morphology**, New York, **244**: 1-14.
- GOULD, S.J. 1966. Allometry and size in ontogeny and phylogeny. **Biological Reviews**, Cambridge, **41**: 587-640.
- GOULD, S.J. 1977. **Ontogeny and phylogeny**. Harvard University Press, Cambridge. 501p.
- GRISS, C. 1990. Mandibular motor neurons of the caterpillar of the hawk moth *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, **296**: 393-402.
- GRONENBERG, W; J. PAUL; S. JUST & B. HÖLLDOBLER. 1997. Mandible muscle fibers in ants: fast or powerful? **Cell & Tissue Research**, New York, **289**: 347-361.

- HAECKEL, E. 1866. **Generelle morphologie der organismen: allgemeine grundzüge der organischen formen-wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte descendenz-theorie.** Reimer, Berlin.
- HALL, B.K. 1992. **Evolutionary developmental biology.** Chapman & Hall, London. 512p.
- HALL, B.K.; R. PEARSON & G.B. MÜLLER. 2003. **Environment, evolution and development: toward a synthesis.** MIT Press, Cambridge. 352p.
- HEDGES, S.B. 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, **9**: 366–369.
- HEMING, B.S. 2003. **Insect development and evolution.** Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca. 444p.
- HUXLEY, J.S. 1950. Relative growth and form transformation. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, **137**: 465-469.
- KAWAKAMI, M. & K. YAKAMURA. 2008. Cranial bone morphometric study among mouse strains. **BMC Evolutionary Biology**, London, **8**: 1-11.
- KENDALL, D.G. 1977. The diffusion of shape. **Advances in Applied Probability**, Sheffield, **9**: 428-430.
- KLINGENBERG, C.P. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. **Biological Reviews**, Cambridge, **73**: 79-123.
- KLINGENBERG, C.P. & J.R. SPENCE. 1993. Heterochrony and allometry: lessons from the water strider genus *Limnoporus*. **Evolution**, Bolder, **47**: 1834-1853.
- KLINGENBERG, C.P. & M. ZIMMERMANN. 1992. Static, ontogenetic and evolutionary allometry: a multivariate comparison in nine species of water striders. **American Naturalist**, Chicago, **140**: 601-620.

- LEE, C.S.; B.A. MCCOOL; J.L. MOORE; D.M. HILLIS & L. GILBERT. 1992. Phylogenetic study of RNA genes. **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, **106**: 17-31.
- LEÓN, M.S.P. & C.P.E. ZOLLIKOFER. 2001. Neanderthal cranial ontogeny and its implications for late hominid diversity. **Nature**, London, **412**: 534-538.
- MAHALANOBIS, P.C. 1936. On the generalized distance in statistics. **Proceedings of the National Institute of Science of India**, Allahabad, **12**: 49-55.
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Baltimore, **27**: 209-220.
- MASUKO, K. 1986. Motor innervation and proprioceptors of the mouthparts in the worker honeybee *Apis mellifera*: I. Mandibular nerve. **Journal of Morphology**, New York, **188**: 51-68.
- MATSUDA, R. 1965. Morphology and evolution of the insect head. **Memoirs of the American Entomological Institute**, Ann Arbor, **4**: 1-34.
- MCKINNEY, M.L. 1986. Ecological causation of heterochrony: a test and implications for evolutionary theory. **Paleobiology**, New York, **12**: 282-289.
- MCKINNEY, M.L. 1988. **Heterochrony in evolution: an multidisciplinary approach**. Plenum Press, New York. 348p.
- MCKINNEY, M.L. & K.J. MCNAMARA. 1991. **Heterochrony: the evolution of ontogeny**. Plenum Press, New York. 437p.
- MCNAMARA, K.J. 1997. **Shapes of time: the evolution of growth and development**. John Hopkins University Press, Baltimore. 342p.
- MICHENER, C.D. 1942. A generic revision of the Heliconiinae (Lepidoptera, Nymphalidae). **American Museum Novitates**, New York, **1197**: 1-8.

- MONTEIRO, L.R. & A.S. ABE. 1999. Functional and historical determinants of shape in the scapula of xenarthran mammals: evolution of a complex morphological structure. **Journal of Morphology**, New York, **241**: 251-263.
- MONTEIRO, L.R. & S.F. REIS. 1999. **Princípios de morfometria geométrica**. Holos, Ribeirão Preto. 188p.
- MÜLLER, A.R.; H. WOLF; S. GALLER & W. RATHMAYER. 1992. Correlation of electrophysiological; histochemical; and mechanical properties in fibres of the coxa rotator muscle of the locust *Locusta migratoria*. **Journal of Comparative Physiology B**, New York, **162**: 5–15.
- NIJHOUT, H.F. 2008. Developmental phenotypic landscapes. **Evolutionary biology**, New York, **35**: 100-103.
- NIJHOUT, H.F. & D.E. WHEELER. 1996. Growth models of complex allometries in holometabolous insects. **American Naturalist**, Chicago, **148**: 40-56.
- NIJHOUT, H.F. & D.J. EMLÉN. 1998. Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, **95**: 3685-3689.
- NYLANDER, J.A.A. 2004. MrModeltest 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- PAUL, J. & W. GRONENBERG. 2002. Motor control of the mandible closer muscle in ants. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, **48**: 255-267.
- PENZ, C.M. 1999. Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, **127**: 277–344.

- PÉRICO, E. & A.M. ARAÚJO. 1991. Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Evolución Biológica**, Santafé de Bogotá, **5**: 59-74.
- PÉRICO, E. 1995. Interação entre quatro espécies de Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) e suas plantas hospedeiras (Passifloraceae) em uma floresta secundária do Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, Porto Alegre, **3**: 3-18.
- POSADA, D. & K.A. CRANDALL. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, Oxford, **14**: 817–818.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2008). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>.
- RAFF, R.A. 1996. **The shape of life: genes, development, and the evolution of animal form**. University of Chicago Press, Chicago. 544p.
- REHDER, V. 1989. Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. **Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, **279**: 499–513.
- RICE, S.H. 2004. Developmental associations between traits: covariance and beyond. **Genetics**, Austin, **166**: 513-526.
- RODRIGUES, D. & G.R.P. MOREIRA. 1999. Feeding preference of *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. **Journal of the Lepidopterists' Society**, Los Angeles, **53**: 108-113.
- RODRIGUES, D. & G.R.P. MOREIRA. 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae) and consequences for adult life history. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, **62**: 321-322.

- RODRIGUES, D. & G.R.P. MOREIRA. 2004. Seasonal variation in larval host plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae) adult body size. **Austral Ecology**, Carlton, **29**: 437–445.
- RODRIGUES, D. & G.R.P. MOREIRA. 2005. Comparative description of the immature stages of two very similar leaf footed bugs, *Holymenia clavigera* (Herbst) and *Anisoscelis foliacea marginella* (Dallas) (Hemiptera, Coreidae, Anisoscelini). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, **49**: 7-14.
- RODRIGUES, D.; D. SANFELICE; L.R. MONTEIRO & G.R.P. MOREIRA 2005. Ontogenetic trajectories and hind tibia geometric morphometrics of *Holymenia clavigera* (Herbst) and *Anisoscelis foliacea marginella* (Dallas) (Hemiptera: Coreidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, **34**: 769-776.
- ROHLF, F.J. 1998. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. **Systematic Biology**, Washington, **47**: 147-158.
- ROHLF, F.J. 2006. TpsDig, version 2.10. Software, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY 11794-5245. <http://life.bio.sunysb.edu/morph.>]
- ROHLF, F.J. 2008. TpsRelw, version 1.11. Software, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY 11794-5245. <http://life.bio.sunysb.edu/morph.>
- ROHLF, F.J. & D.E. SLICE. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Zoology**, Washington, **39**: 40-59.
- RONQUIST, F. & J.P. HUELSENBECK. 2003. Mrbayes 3.0b4: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, **19**: 1572.

- ROTH, V.L. & J.M. MERCER. 2000. Morphometrics in development and evolution. **American Zoology**, New York, **40**: 801-810.
- SACCO, J.C. 1980. Passifloráceas, p.1-132. *In*: R. REITZ (Ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí.
- SAITOU, N. & M. NEI. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, **4**: 406-425.
- SCOBLE, M.J. 1992. **The Lepidoptera form, function and diversity**. Oxford University Press, New York. 404p.
- SILLÉN-TULLBERG, B. 1988. Evolution of gregariousness in aposematic butterfly larval: a phylogenetics analysis. **Evolution**, Bolder, **42**: 293-305.
- SILVEIRA, M.A.P.A. 2002. **Variação da dureza da folha em *Passiflora*, efeito no desgaste das mandíbulas de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae) e conseqüências sobre a herbivoria**. Dissertação de Mestrado em Biologia Animal, UFRGS, Porto Alegre.
- SINERVO, B. & R. HUEY. 1990. Allometric engineering: an experimental test of the causes of interpopulational differences in performances. **Science**, Washington, **248**: 1106-1109.
- SMITH, K.K. 2003. Time's arrow: heterochrony and the evolution of development. **International Journal of Developmental Biology**, Leioa, **47**: 613-621.
- SNODGRASS, R.E. 1935. **Principles of insect morphology**. McGraw Hill Company, New York. 667p.
- STEHR, F.W. 1987. Order Lepidoptera, p. 288-305. *In*: F.W. STEHR (Ed.). **Immature Insects**. Dubuque, Kendall/Hunt, Vol.1, XII+754p.

- STERN, D.L. & D.J. EMLÉN. 1999. The development basis for allometry in insects. **Development**, Cambridge, **126**: 1091-1101.
- STICHEL, H. 1906. Lepidoptera, fam. Nymphalidae, subfam. Heliconiinae. *In*: P. WYTSMAN (Ed.), **Genera Insectorum**, Brussels, **37**: 1-74.
- SUOMALEINEN E.; L.M. COOK & J.R.G. TURNER. 1971. Chromosome numbers of heliconiine butterflies from Trinidad, West Indies (Lepidoptera, Nymphalidae). **Zoologica**, New York, **56**: 121–124.
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland.
- TAMURA, K.; J. DUDLEY; M. NEI & S. KUMAR. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, **24**: 1596-1599
- TAMURA, K.; M. NEI & S. KUMAR. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, **101**: 11030-11035.
- TAMURA K. & M. NEI. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, **10**: 512-526.
- THOMPSON, D.W. 1917. **On growth and form**. Abridged edition. J.T. Bonner (Ed). 1992. Cambridge University Press, Cambridge. 368p.
- TURNER, J.R.G. 1968. Some new *Heliconius* pupae: their taxonomic and evolutionary significance in relation to mimicry. **Journal of Zoology**, London, **155**: 311–325.

- TURNER, J.R.G. 1976. Adaptive radiation and convergence in subdivisions of the butterfly genus *Heliconius*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, **58**: 297-308.
- VEGLIANTE, F. 2005. Larval head anatomy of *Heterogynis penella* (Zygaenoidea, Heterogynidae), and a general discussion of caterpillar head structure (Insecta, Lepidoptera). **Acta Zoologica**, Stockholm, **86**: 167-194.
- VINICIUS, L. & M.M. LAHR. 2003. Morphometric heterochrony and the evolution of growth. **Evolution**, Bolder, **57**: 2459-2468.
- WEBSTER, M. & M.L. ZELDITCH. 2005. Evolutionary modifications of ontogeny: heterochrony and beyond. **Paleobiology**, New York, **31**: 354-372.
- WHEATER, C.P. & M.E.G. EVANS. 1989. The mandibular forces and pressures of some predaceous Coleoptera. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, **35**: 815-820.
- WOLF, J.B. 2002. The geometry of phenotypic evolution in developmental hyperspace. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, **99**: 15849-15851.
- WOLF, J.B.; W.A. FRANKINO; A.F. AGRAWAL; E.D. BRODIE & A.J. MOORE. 2001. Development interactions and the constituents of quantitative variation. **Evolution**, Bolder, **55**: 232-245.
- Wu, R. & W. Hou. 2006. A hyperspace model to decipher the genetic architecture of developmental processes: allometry meets ontogeny. **Genetics**, Austin, **172**: 627-637.
- ZELDITCH, M.L.; D.L. SWIDERSKI; H.D. SHEETS & W.L. FINK. 2004. **Geometric morphometrics for biologists: a primer**. Elsevier Academic Press, New York. 437p.

- ZELDITCH, M.L.; F.L. BOOKSTEIN & B.L. LUNDRIGAN. 1993. The ontogenetic complexity of developmental constraints. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, **6**: 621-641.
- ZELDITCH, M.L.; H.D. SHEETS & W.L. FINK. 2000. Spatiotemporal reorganization of growth rates in the evolution of ontogeny. **Evolution**, Bolder, **54**: 1363-1371.
- ZELDITCH, M.L.; H.D. SHEETS & W.L. FINK. 2001. The spatial complexity and evolutionary dynamics of growth, p.145-194. *In*: M.L. ZELDITCH (Ed.). **Beyond heterochrony: the evolution of development**. Wiley-Liss Inc., Wilmington. 392p.
- ZELDITCH, M.L. & W.L. FINK. 1995. Allometry and developmental integration of body growth in a piranha, *Pygocentrus nattereri* (Teleostei, Ostariophysi). **Journal of Morphology**, New York, **223**: 341-355.
- ZELDITCH, M.L.; W.L. FINK & D.L. SWIDERSKI. 1995. Morphometrics, homology, and phylogenetics: quantified characters as synapomorphies. **Systematic Biology**, Washington, **44**: 179-189.
- ZELDITCH, M.L., W.L. FINK, D.L. SWIDERSKI & B.L. LUNDRIGAN. 1998. On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny: a reply to Rohlf. **Systematic Biology**, Washington, **47**:159-167.

