

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Leonardo Ré Jorge



VARIAÇÃO MORFOLÓGICA DEPENDENTE DA PLANTA
HOSPEDEIRA NA BORBOLETA *Heliconius erato phyllis*
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Leonardo Ré Jorge
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Ecologia

Orientador: Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas

Co-orientador: Prof. Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

J768v

Jorge, Leonardo Ré

Varição morfológica dependente da planta hospedeira na borboleta *Heliconius erato phyllis* (Lepdoptera: Nymphalidae) / Leonardo Ré Jorge. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: André Victor Lucci Freitas, Gilson Rudinei Pires Moreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Plasticidade fenotípica. 2. Morfometria. 3. Heliconiini. 4. Passifloraceae. 5. Lepidoptera. I. Freitas, André Victor Lucci. II. Moreira, Gilson Rudinei Pires. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Host-plant dependent wing morphometric variation in the butterfly *Heliconius erato Phyllis* (Nymphalidae).

Palavras-chave em inglês: Phenotypic plasticity; Morphometry; Heliconiini; Passifloraceae; Lepidoptera.

Área de concentração: Ecologia.

Titulação: Mestre em Ecologia.

Banca examinadora: André Victor Lucci Freitas, Mario Almeida Neto, Thomas Michael Lewinsohn.

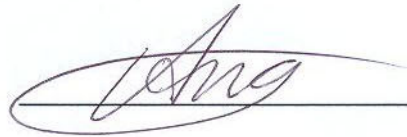
Data da defesa: 26/06/2009.

Programa de Pós-Graduação: Ecologia.

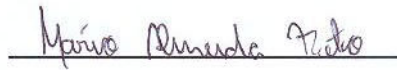
Campinas, 26 de junho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas
(orientador)



Prof. Dr. Mario Almeida Neto



Prof. Dr. Thomas Michael Lewinsohn



Prof. Dr. Woodruff Whitman Benson

Prof. Dr. Ronaldo Bastos Francini

**“Na vida, quem perde o
telhado em troca recebe as estrelas”**

Tom Zé

**“In essence, my belief consists of a humble
admiration for this illimitable superior wisdom that
reveals itself in the slight details that we are able to
perceive with our frail and feeble minds.”**

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Corro o risco de ter os agradecimentos como a maior seção da dissertação, mas eu acredito que nada que fazemos é fruto de esforço isolado, e uma infinidade de pessoas contribuiu de alguma forma para eu chegar a esse momento. Portanto, por favor não durmam antes de chegar no final (pelo menos dos agradecimentos) e desde já peço desculpas a quem eu esqueci de colocar aqui.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores: Ao Prof. André Freitas, pelo apoio em todas as fases de desenvolvimento da tese, e principalmente por encontrar o difícil equilíbrio entre cobrança e liberdade. Ao Prof. Gilson Moreira, por me receber de maneira tão acolhedora ao seu laboratório e me “salvar” no momento mais difícil de desenvolvimento do trabalho. Ao Pedro Cordeiro-Estrela por me introduzir à morfometria geométrica, e mesmo a distância estar disposto a resolver todas as minhas dúvidas e problemas e ao Prof. Louis Bernard Klaczko, primeiro por toda a orientação durante a graduação e depois pelo auxílio numa compreensão mais profunda dos resultados do trabalho.

Agradeço também ao Renato Ramos e ao Abner Elpino-Campos por fornecerem os organismos que eu utilizei no trabalho. Se os orientadores foram a base intelectual, vocês foram a base material para que esse trabalho pudesse ser desenvolvido. Agradeço também à secretária de pós-graduação da Ecologia, Célia, por todos os galhos quebrados.

Gostaria de agradecer aos membros da pré-banca e da banca, pela paciência em ler essa versão ou anterior da dissertação, e contribuir fortemente para a melhora deste trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório, tanto do LMCI da Ufrgs (Abner, Ana, Danessa, Darli, Denis, Denise, Erica, Kim, Kristina, Mariana e Quéli), que me receberam de maneira tão amigável e mantiveram minha sanidade mesmo quando

achei que não ia ter tese para defender, como do laboratório aqui da Unicamp (Cristiane, Daniela, Danilo, Eduardo, Karina, Lucas, Marcio e Tatiane), que contribuíram com idéias, discussões, e descontração para a escrita da tese

Aos colegas do programa de pós-graduação em ecologia, pelas discussões em disciplinas, palestras e bioforums, que contribuíram muito para minha formação e também para clarear idéias do projeto. Especialmente aos colegas do grupo de pesquisa, dos laboratórios do prof. André e o de formigas, pelos seminários e pelos cafés e bandejões que mantiveram as idéias e o nível de cafeína e de diversão num patamar aceitável para a escrita de uma dissertação.

Aos diversos professores que foram essenciais para a minha formação. Começo pelos professores que tive durante o mestrado, que contribuíram fortemente para que eu aprofundasse meus conhecimentos em ecologia, especialmente os professores do curso de campo – Glauco, Paulo Inácio, Paulo “Miúdo”, e Mario – e aos Profs. Thomas e Benson. Em seguida a professores da graduação que também foram muito importantes na minha formação como biólogo e cientista, especialmente aos profs. George Shepherd, Ângelo Cortelazzo, Keith Brown, Claudia Magalhães, Dora Kassisse, Ivan Sazima, Louis Bernard, Paulo Oliveira e Thomas Lewinsohn. Finalmente, agradeço a alguns professores que tive durante a educação básica, que foram muito importantes para minha formação como ser humano: Marchetti, Laerte, Joaquim, Vânia, Muneratti e Utabajara (afinal, a biologia não é linda?).

Aos amigos do ensino médio, especialmente os incrédulos, agora amigos há quase 10 anos. Aos colegas de graduação, não só da minha turma, mas a todos que compartilharam alguma idéia maluca comigo (representação discente, projeto de extensão, centro acadêmico, astrofágicos, monitoria, e tantas outras). Especialmente à Natalie, que me passou o salutar vício da representação discente e do CAB; ao Gustavo, companheiro nas burocracias da representação discente e um Gugol para qualquer

informação sobre qualquer coisa desta universidade; à Francine, que (não só) durante minha participação no VEJA foi uma grande amiga e fonte de reflexões muito interessantes; e à Ayana, que compartilhou a idéia mais maluca de todas, de trabalhar com teoria ecológica e evolução, e que tem sido uma fonte infindável de discussões e idéias nessas áreas e em muitas outras.

A todas as pessoas com quem eu já morei aqui em Campinas ou no RS e que certamente foram muito importantes para eu aprender a conviver e me virar por aí. Especialmente ao João, com quem eu morei a maior parte do tempo desde que saí de São Paulo e que é um exemplo de simpatia e convívio, e aos atuais companheiros de casa que me agüentaram nessa correria final.

À minha família em Campinas, que mesmo com parte dela a muitos quilômetros de distância, continua sendo uma família: Dani, Marcela, Mario, Tarcila e Joaquim, Chabes, Paulo, Lynda e bebezada, Aline, Vinicius. Não só essa tese não teria acontecido, mas a pessoa que eu sou hoje não faria sentido se não fosse por vocês.

Finalmente, à minha família, que independente de qualquer coisa que eu disser aqui, continuará sendo a base e a essência da pessoa que eu sou. Que mesmo não entendendo como alguém pode ficar mais de dois anos estudando asas de borboleta, sempre me apoiou de forma inequívoca. Que cada um a seu modo, contribuíram muito para que eu pudesse passar por cada fase da vida de forma a amadurecer de forma equilibrada.

ÍNDICE

RESUMO	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO GERAL	5
PLASTICIDADE FENOTÍPICA	5
A INTERAÇÃO INSETO HERBÍVORO-PLANTA HOSPEDEIRA	8
ASSIMETRIA FLUTUANTE	10
MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	13
HELICONIINI E PASSIFLORACEAE	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 1: Host-Plant dependent wing morphometric variation in the butterfly <i>Heliconius erato phyllis</i> (Nymphalidae)	24
INTRODUCTION	24
MATERIAL AND METHODS	28
Study sites and butterfly rearing	28
Data acquisition and morphometrics	29
Size and Shape variation	30
Asymmetry study	31
RESULTS	32
Shape and size variation	32
Asymmetry	33
DISCUSSION	34
Shape variation	36
Asymmetry	38
Conclusion	39
REFERENCES	40

TABLES	45
FIGURES:	47
CONCLUSÃO GERAL	50

RESUMO

Insetos fitófagos e suas plantas hospedeiras são um modelo valioso no estudo da influência do ambiente sobre o fenótipo, uma vez que estas são a única fonte de alimento e modulam a interação do herbívoro com outras espécies. Dado esse papel preponderante, espera-se que a planta hospedeira exerça influência em diversas características dos herbívoros, das mais diretamente relacionadas ao desempenho a diferenças sutis na morfologia. Além disso, deve haver relação inversa entre o desempenho e a magnitude da assimetria flutuante dos indivíduos criados em cada uma das hospedeiras. Para testar essas expectativas, estudamos o tamanho e a forma das asas, e sua assimetria, na borboleta *Heliconius erato phyllis*. Por meio das ferramentas da morfometria geométrica, testamos se havia variação em forma e tamanho entre indivíduos criados em diferentes hospedeiras e testamos também se havia assimetria direcional e flutuante. Detectamos uma variação marcada na forma das asas entre indivíduos que consumiram diferentes hospedeiras, uma assimetria direcional muito consistente, além de resultados pouco consistentes para a assimetria flutuante. Os resultados observados reforçam o papel da plasticidade fenotípica e das plantas hospedeiras na variação morfológica de insetos fitófagos, além de contribuírem com as atuais críticas à assimetria flutuante como indicadora de desempenho.

Palavras-chave: Plasticidade fenotípica, morfometria geométrica, Heliconiini, Passifloraceae, instabilidade no desenvolvimento

ABSTRACT

Phytophagous insects and its host plants are a valuable model to study how the environment can influence an organism's phenotype, as plants are the only food source and mediate the herbivore's interaction with other species. It is expected that the host exerts influence on diverse herbivore traits, from those directly related to performance to subtle differences in morphology. Além disso, deve haver relação inversa entre o desempenho e a magnitude da assimetria flutuante dos indivíduos criados em cada uma das hospedeiras. Besides, an inverse relationship between performance and fluctuating asymmetry is expected for individuals reared on different hosts. To test these expectations, we investigate variation in wing size, shape and asymmetry in the butterfly *Heliconius erato phyllis*. By using geometric morphometrics tools, we tested size and shape variation among hosts and also tested fluctuating and directional asymmetry in shape and size. We detected a strong wing shape variation among individuals reared on different host species, a very consistent directional asymmetry and inconsistent results for fluctuating asymmetry. The observed results reinforce the role of phenotypic plasticity and of the host-plants in the morphological variation of phytophagous insects, besides contributing to the current criticism raised against fluctuating asymmetry as an index of performance.

Key words: phenotypic plasticity, geometric morphometrics, Heliconiini, Passifloraceae, developmental instability

INTRODUÇÃO GERAL

PLASTICIDADE FENOTÍPICA

A variação fenotípica nas populações é considerada, desde o início dos estudos evolutivos, a matéria prima sobre a qual seleção natural atua (Darwin, 1859). As causas dessa variação presente nas populações é foco de discussões desde os primórdios do pensamento ocidental, na forma da controvérsia entre natureza e meio ambiente (Pigliucci, 2001). Desde a redescoberta das leis de Mendel e do advento da síntese evolutiva moderna, os fatores ambientais foram considerados de forma secundária, como um elemento sem relevância na evolução biológica, apenas com alguns poucos autores destacando sua importância em diferentes períodos. Já que não estavam sujeitos à seleção natural, eram vistos como ruído, e até mesmo um obstáculo à seleção natural. A partir da década de 1980, após o acúmulo de um grande volume de evidências de que a plasticidade fenotípica é um fenômeno amplamente difundido na natureza e que existe grande variabilidade genética na sua expressão em diversos caracteres (fenômeno genericamente denominado interação entre genótipo e ambiente) é que iniciou-se uma compreensão mais integrada do fenótipo (Pigliucci, 2005).

A plasticidade fenotípica pode ser definida como a capacidade de um genótipo de expressar fenótipos distintos quando exposto a diferentes ambientes (Gotthard & Nylin, 1995). Uma ferramenta conceitual de grande importância na compreensão da plasticidade, e que deriva diretamente de sua definição, é a norma de reação, que pode ser definida como a amplitude de variação dos fenótipos produzidos por determinado genótipo ao longo de um gradiente ambiental. A melhor forma de compreender uma norma de reação, e conseqüentemente a importância da plasticidade fenotípica, é de maneira gráfica (Fig.1). Quando se “plotam” os fenótipos gerados por determinados genótipos (ou diferentes famílias, na maioria dos casos práticos) como uma curva ao longo de um gradiente ambiental, é possível detectar tanto a existência de plasticidade

fenotípica em cada um dos genótipos (uma inclinação diferente de zero nas curvas, casos 1 e 3) como a existência de variação genética para essa plasticidade (diferenças nas inclinações das curvas). No entanto, as curvas que descrevem as normas de reação não são necessariamente lineares, podendo haver casos com polinômios de ordem superior (Rocha *et al.*, 2009; Gibert *et al.*, 1998).

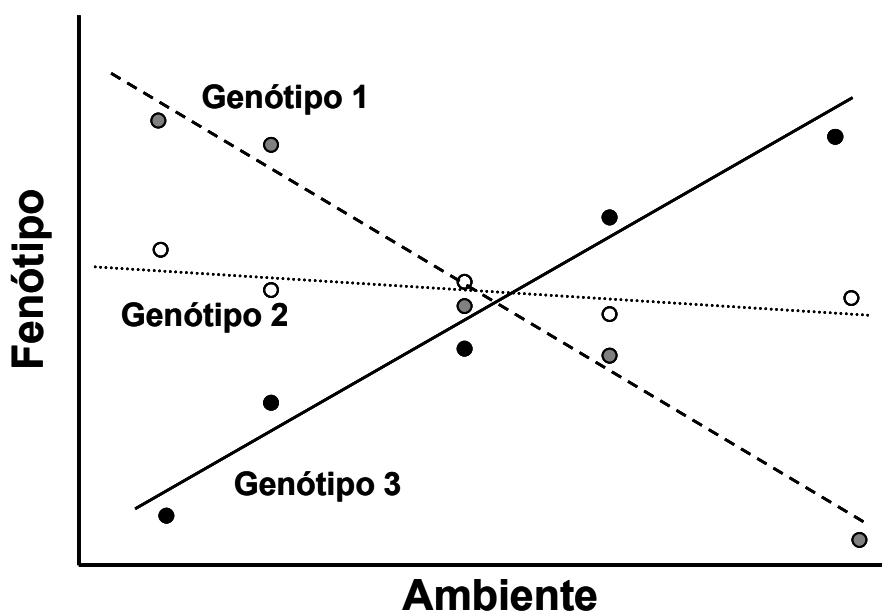


Figura 1: Três normas de reação hipotéticas, mostrando a variação em determinada característica fenotípica para três genótipos diferentes quando submetidos a diferentes condições ambientais. (Adaptado de Pigliucci *et al.*, 2006)

Um ponto importante a ser levantado sobre a plasticidade, é que a mesma não é necessariamente adaptativa. Ela pode ser o resultado direto de diferentes estímulos ambientais sobre os processos bioquímicos e fisiológicos do desenvolvimento (Gotthard & Nylin, 1995). Esse tipo de variação deve ser muito comum, e é esperado, já que o ambiente inclui todas as matérias primas e condições físicas às quais o organismo está exposto durante o desenvolvimento. O que se espera é que o genótipo tenha a

capacidade de modular o desenvolvimento de forma a tamponar efeitos deletérios causados por essas variações no meio. Essa combinação entre o genótipo e a variação ambiental pode se dar por seleção natural atuando sobre a variação genética para a plasticidade, e tem sido denominada acomodação genética (Pigliucci et al., 2006; West-Eberhard, 2003). Ela pode levar a um aumento ou a uma redução na plasticidade, dependendo do tipo de variação no ambiente. Quando há uma mudança ambiental, e o novo ambiente se torna predominante, espera-se que a seleção atue reduzindo a plasticidade, por meio de canalização do fenótipo ótimo no novo ambiente. Quando há variação nos ambientes encontrados pela população, a expectativa é de que a seleção module essas normas de reação, gerando plasticidade fenotípica adaptativa (Braendle & Flatt, 2006).

Nessa definição geral de plasticidade, estão inclusas variações que se dão em vários níveis de organização do organismo: bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e comportamentais. Geralmente, mas não exclusivamente, a fisiologia e o comportamento respondem ao ambiente de forma rápida, havendo alterações nessas características várias vezes ao longo do período de vida de um indivíduo. A maior parte dos casos de plasticidade na morfologia, no entanto, é resultado de estímulos ambientais atuando durante as primeiras fases do desenvolvimento, sendo portanto irreversíveis, ou de resposta lenta (Pigliucci et al., 2006). No caso específico de insetos holometábolos, toda a morfologia do adulto é definida durante o desenvolvimento das fases imaturas, e irreversível após a metamorfose.

Além dessa variação no tempo e reversibilidade da plasticidade, há uma grande diversidade de estímulos ambientais que podem gerar respostas fenotípicas. Historicamente, os trabalhos clássicos acerca de influências ambientais no fenótipo estudaram influências da temperatura, no caso de animais, e do fotoperíodo, no caso de plantas, por serem as duas variáveis ambientais mais facilmente medidas e controladas

experimentalmente. Especificamente no caso dos insetos herbívoros, a planta hospedeira é um fator ambiental preponderante, e a variação em aspectos da história de vida dependente da planta hospedeira tem sido amplamente estudada, apesar de em geral não ser explicitamente tratada como um caso de plasticidade fenotípica (ver porém Nylin & Janz 2009).

A INTERAÇÃO INSETO HERBÍVORO-PLANTA HOSPEDEIRA

A interação entre insetos fitófagos e suas plantas hospedeiras é a relação trófica dominante no planeta. Não se conhece nenhuma espécie de planta que não sofra herbivoria por alguma espécie de inseto, e cerca de metade das espécies de insetos tem hábito de vida herbívoro, o que conjuntamente constitui metade da biodiversidade conhecida (Price 2002).

A grande maioria das espécies de insetos herbívoros estabelece uma forte interação com suas hospedeiras, realizando todo o desenvolvimento larval e se alimentando de um único indivíduo (Bernays & Chapman, 1994). Por isso, a planta hospedeira é um dos fatores ambientais mais importantes a ser considerado na história de vida de um fitófago, e essa importância se dá tanto por efeitos diretos como indiretos. Atuando diretamente, variações na quantidade e qualidade de nutrientes e a presença de compostos químicos potencialmente tóxicos aos imaturos podem exercer grande influência sobre o desempenho dos adultos. Além disso, características da planta podem modular indiretamente as espécies que interagem com o herbívoro. A produção de compostos voláteis e recompensas podem atrair predadores e parasitóides; outros herbívoros podem utilizar a mesma planta e competir por alimento; e, finalmente, a presença de mutualistas, que podem estar diferencialmente distribuídos entre as plantas hospedeiras, também são fatores muito importantes no desempenho de um dado herbívoro (Oliveira & Freitas, 2004).

Existe uma extensa literatura relacionando o desempenho dos herbívoros às plantas hospedeiras em que se desenvolveram, na maior parte das vezes levando em conta alguns dos fatores citados acima (West & Cunningham, 2002). Curiosamente, esses trabalhos não discutem seus resultados baseados na plasticidade fenotípica. Em geral, o ponto de vista adotado é o da otimização da aptidão da fêmea no comportamento de oviposição. Essa é uma abordagem importante, e que permitiu uma compreensão bastante avançada do processo de seleção de planta hospedeira. No entanto, estudar esse tipo de variação como uma norma de reação pode trazer uma percepção diferente da adaptabilidade de tais padrões. Recentemente, Nylin & Janz (2009) atentaram para esse fato, argumentando que dois aspectos diferentes do uso de hospedeiras podem ser interpretados como plasticidade fenotípica. Tanto a variação nos indicadores de desempenho (p.ex. mortalidade, tamanho e tempo de desenvolvimento) entre indivíduos criados em diferentes plantas hospedeiras como o próprio fato do animal ser capaz de utilizar diversas plantas que apresentam variações em diversos aspectos, são um ajuste do desenvolvimento a diferentes condições ambientais. No processo de colonização de plantas hospedeiras, espera-se que a seleção natural atue reduzindo a plasticidade do herbívoro nos componentes do desempenho, o que pode ser compreendido como um processo de canalização do desenvolvimento. Esse processo, no entanto, se dá por um aumento de plasticidade nos aparatos de detoxificação de compostos secundários. Portanto, dependendo do ponto de vista, o processo de colonização de uma nova planta hospedeira pode ser interpretado como um aumento ou uma redução na plasticidade fenotípica.

Uma forma de compreender melhor esse problema é o estudo de características que não sofrem ação direta da seleção natural, mas podem ser também alteradas durante o desenvolvimento. Uma medida desse tipo, que tem sido extensamente estudada e será discutida na próxima sessão, é a assimetria flutuante (AF). Uma outra abordagem

também utilizada neste trabalho é o estudo de variações sutis na forma da asa, verificando se as diferentes plantas hospedeiras induzem consistentemente diferentes padrões de forma.

ASSIMETRIA FLUTUANTE

A capacidade de um organismo de controlar o seu desenvolvimento de maneira a reverter perturbações nos processos desenvolvimentais é conhecida como estabilidade no desenvolvimento (Dongen, 2006). Estruturas com simetria bilateral, como membros e asas, compartilham o mesmo genoma e as mesmas condições ambientais ao longo do desenvolvimento. A estabilidade no desenvolvimento, no entanto, depende da resistência do organismo a perturbações em diferentes locais do plano de corpo. Por isso, diferenças sutis e aleatórias entre os lados direito e esquerdo supostamente refletem uma instabilidade nesse processo, causada pela incapacidade de neutralizar as perturbações no desenvolvimento que atuam independentemente em cada lado do corpo. Esse padrão de diferenças aleatórias entre os lados de estruturas simétricas é denominado assimetria flutuante (AF), e constitui um indicador de instabilidade no desenvolvimento amplamente utilizado nas últimas décadas (Palmer & Strobeck, 1986).

Historicamente, o principal emprego da AF é como indicador de estresse ao longo do desenvolvimento. Organismos sob estresse, tanto ambiental como genético, devem receber mais estímulos perturbadores e, portanto, apresentar maior instabilidade e conseqüentemente maior AF. Além disso, propôs-se que a AF pudesse servir de indicador do desempenho, ou aptidão dos indivíduos. Seguindo raciocínio semelhante ao anterior para o estresse, um organismo que tivesse tanto um aparato genético harmônico como bem adaptado ao ambiente em que ocorreu o desenvolvimento, teria menor susceptibilidade a perturbações ao longo do desenvolvimento, apresentando menor AF (Lens et al., 2002). Tão antigo como o emprego da AF como ferramenta indicadora de

estresse e aptidão são as controvérsias em torno de seu uso (Lens et al., 2002). O problema mais frequentemente levantado é a separação entre a AF e outros tipos de assimetria. Como a diferença entre os lados é uma única medida, a AF só pode ser separada desses outros tipos de assimetria em um conjunto de indivíduos que tenham suas medidas aferidas (Van Valen, 1962). Os outros tipos de assimetria possíveis são assimetria direcional e antissimetria. A diferenciação entre esses três padrões é percebida pela distribuição das diferenças entre as medidas dos dois lados do corpo (Fig. 2). Na assimetria flutuante, os desvios são considerados aleatórios, e a maioria dos modelos assume uma distribuição normal em torno de um valor médio de zero. No entanto, como a natureza desses desvios não é bem esclarecida, alguns modelos pressupõem também uma distribuição poisson ou binomial. Na assimetria direcional, há um desvio consistente para um dos lados, formando uma distribuição em torno de um valor diferente de zero. Já na antissimetria, que é mais rara, há um desvio consistente, mas com direção aleatória. Um exemplo clássico e extremo de antissimetria são os machos dos caranguejos chamaré (*Uca* spp.), que possuem uma das quelas muito maior do que a outra, mas animais com cada uma das quelas aumentada ocorrem em igual frequência na natureza (Backwell et al. 2007). Esse tipo de assimetria gera um padrão bimodal, ou então em casos mais amenos uma distribuição platicúrtica, de média zero, nas diferenças entre os lados.

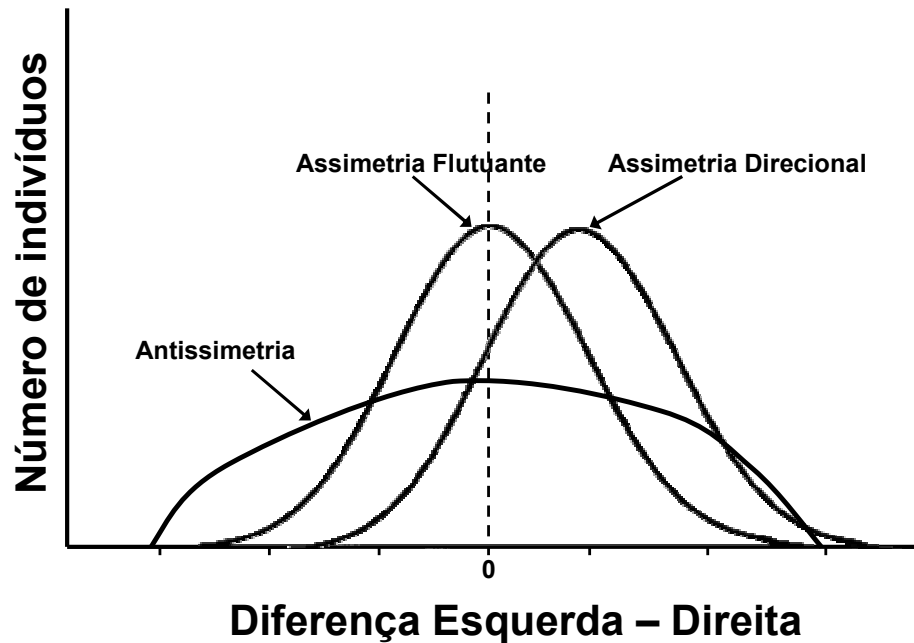


Figura 2: Padrões de distribuição populacional das diferenças entre o lado direito e esquerdo nos três tipos de assimetria comumente observados na natureza.

A assimetria direcional e a antissimetria têm uma determinação genética, e portanto não servem como indicadores de estresse ou desempenho. Por isso, é necessário estudar a AF separadamente desses outros padrões de assimetria. Ferramentas estatísticas para separar esses tipos de assimetria foram desenvolvidas (Palmer & Strobeck, 1986; Klingenberg & McIntyre, 1998), mas além de envolverem um esforço amostral considerável, já que são necessárias medidas repetidas dos dois lados de cada indivíduo, não garantem a separação total entre os diferentes fatores. Quando a assimetria direcional é muito alta é difícil detectar os efeitos da AF. Por outro lado, mesmo quando há antissimetria misturada a AF, o padrão de distribuição dos desvios pode se ajustar a uma distribuição normal, mascarando os efeitos da antissimetria.

Outro problema mais profundo é o fato de que a relação entre AF e instabilidade no desenvolvimento não é inequívoca. Como a AF é uma única medida que pretende estimar uma grandeza que é uma variância, espera-se que haja uma relação fraca entre

ela e a instabilidade total no desenvolvimento. Além disso, outros tipos de perturbação no desenvolvimento podem não levar à AF, como efeitos de maior escala que não atuem independentemente nos dois lados do corpo (Dongen, 2006). Além disso, a compreensão de como o ruído causado por variações estocásticas durante o desenvolvimento leva à assimetria, e sua interação com o estresse e a aptidão, são muito pouco conhecidos. À medida em que se avança na compreensão da complexidade da arquitetura genética e sua interação com o meio ambiente, se percebe que a maioria dos efeitos das perturbações se dá de forma não-linear, dificultando a inclusão desses processos em modelos de tradução deles em alterações na AF. Devido a esse conjunto de fatores, a AF tem sido considerada com muita cautela como indicadora de estresse e aptidão. A maioria dos autores que revisaram esse tema aconselha que futuros trabalhos busquem medir efeitos no desempenho de forma mais direta.

MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

O estudo quantitativo da forma dos organismos data dos primórdios dos estudos em estatística. Ao estabelecer o coeficiente de correlação em 1888, Francis Galton já o aplicou à relação entre medidas morfológicas humanas (Mitteroecker & Gunz, 2009). Nas décadas seguintes, durante a primeira metade do século XX, desenvolveram-se os métodos hoje conhecidos como morfometria tradicional, ou multivariada. Esse conjunto de técnicas baseia-se na aplicação de estatística multivariada a diversas medidas de um organismo. Geralmente, as medidas utilizadas são comprimentos e larguras de estruturas ou distâncias entre marcos anatômicos, e em alguns casos ângulos ou razões entre distâncias (Rohlf & Marcus, 1993). Essas técnicas foram amplamente utilizadas durante a maior parte do século XX, por permitirem o tratamento estatístico e a visualização conjunta de um grande número de variáveis morfológicas, por meio de métodos de ordenação e quantificação de distâncias totais no espaço de variáveis entre os indivíduos.

Essas técnicas no entanto apresentam problemas quanto à impossibilidade de recuperar a forma original ou as diferenças em forma entre os organismos a partir das matrizes de distâncias. Há também grande perda de informação quando se trata as variáveis separadamente, sem considerar as relações entre elas no organismo. Além disso, essa morfometria tradicional enfrenta problemas para tratar separadamente forma e tamanho, o que dificulta a detecção de alometria (Rohlf & Marcus, 1993).

Por essas razões, a partir da década de 1980 iniciou-se uma verdadeira revolução nos estudos de morfometria, com o avanço conjunto em diferentes áreas. O primeiro deles foi um avanço técnico: a grande melhora e a popularização de ferramentas computacionais e equipamentos de captura de imagens digitais permitiram que marcos anatômicos fossem registrados de maneira sistemática e que grades de deformação desses marcos fossem produzidas computacionalmente. Além disso, ocorreram avanços teóricos, como a produção de uma teoria estatística da forma e sua aplicação em métodos de superposição de conformações de marcos anatômicos. Esses avanços teóricos e técnicos resultaram numa nova forma de abordar o estudo da forma nos organismos, denominada morfometria geométrica, dado que esse conjunto de técnicas permite que a geometria das configurações de marcos anatômicos seja preservada até a apresentação de resultados estatísticos (Mitteroecker & Gunz, 2009).

O método mais difundido de análise no contexto da morfometria geométrica é a superposição por Procrustes (Bookstein, 1991, 1996; Dryden & Mardia, 1998, Monteiro & Reis, 1999). Inicia-se a aplicação desse método definindo marcos anatômicos, que são mapeados em todos os indivíduos. Esses marcos são estruturas que sejam homólogas entre todos os espécimes estudados e possam ser localizados como pontos fixos. O conjunto de coordenadas representando as posições de todos os marcos anatômicos mapeados em cada um dos indivíduos será então utilizado como o conjunto de variáveis em todas as análises. Para a extração das informações de forma e tamanho, o conjunto

de pontos em cada indivíduo deve ter essas informações isoladas entre si, e de variações triviais como a posição e localização dos espécimes no momento da captura das imagens. Esse procedimento é exemplificado na Figura 3, para dois quadriláteros. Dado um conjunto qualquer de configurações de marcos anatômicos (Fig. 3A), o primeiro passo é a centralização de todos os indivíduos num mesmo ponto de origem (Fig. 3B). Esse ponto centralizado é o centróide de cada uma das configurações, ou seja, o ponto médio de todos os marcos anatômicos em ambas as coordenadas. Em seguida, todos os indivíduos são padronizados para o mesmo tamanho (Fig. 3C). Essa padronização é feita a partir do tamanho do centróide, definido como a raiz quadrada da soma do quadrado das distâncias de cada marco anatômico em relação ao centróide da configuração de marcos. Cada indivíduo tem todas as coordenadas de marcos anatômicos divididas pelo tamanho do centróide. Assim, a forma da conformação de pontos não é alterada, e as informações sobre tamanho são extraídas. Por último, todos os indivíduos são rotacionados de forma a minimizar as distâncias médias entre os marcos anatômicos homólogos de cada indivíduo (Fig. 3D).

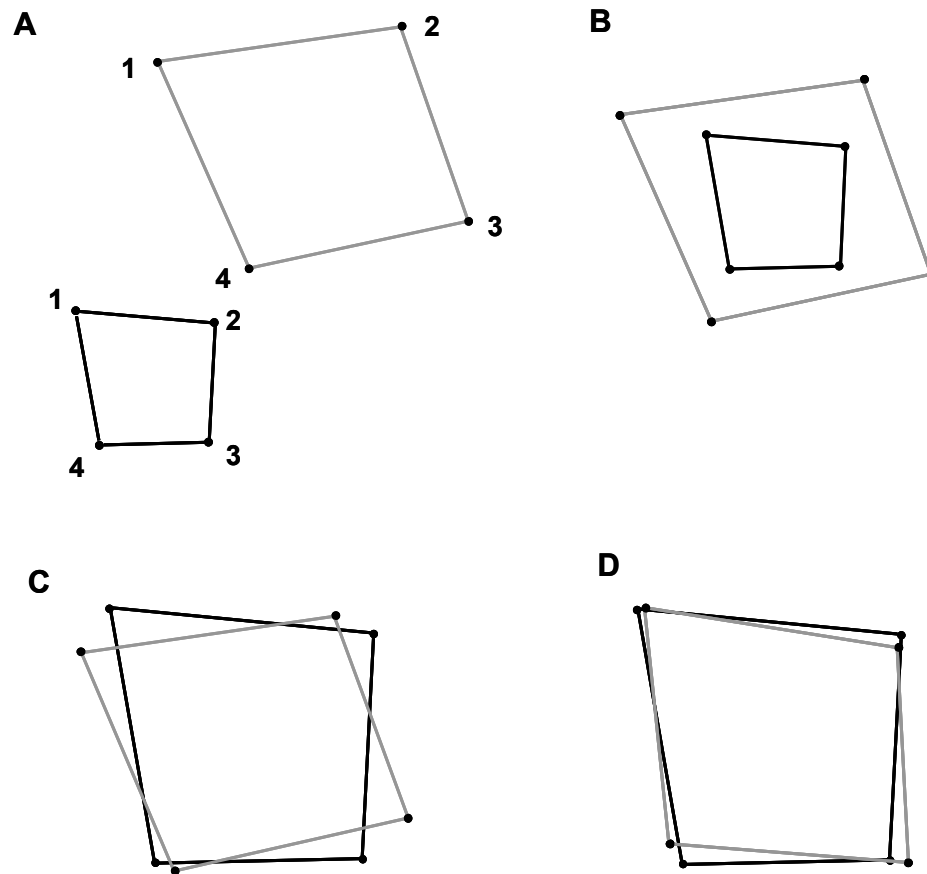


Figura 3: Procedimentos realizados durante a superposição de Procrustes. A) Duas configurações de quatro marcos anatômicos. B) As mesmas configurações após terem seus centróides localizados no mesmo ponto. C) Após a correção para o tamanho. D) Configurações rotacionadas de forma a minimizar os quadrados das distâncias entre os pontos. (Adaptado de Mitteroecker & Gunz, 2009)

As novas configurações de marcos anatômicos de cada indivíduo são denominadas coordenadas de forma de Procrustes, e a forma média de todos os indivíduos é conhecida como forma consenso. As coordenadas de formas de Procrustes apresentam mais variáveis do que o número real de dimensões nos dados, já que houve uma restrição no número de dimensões de variação ao fazer a superposição. Por isso,

para utilizar essas coordenadas em análises estatísticas multivariadas, é necessário algum procedimento de redução da dimensionalidade. O procedimento utilizado neste trabalho foi uma Análise de Componentes Principais (PCA). Os eixos de PCA são usados como variáveis de forma, e as coordenadas de Procrustes originais são utilizadas como referência para que os resultados de testes sejam exibidos como variações em forma das configurações de marcos anatômicos (como implementado em Baylac, 2007).

HELICONIINI E PASSIFLORACEAE

As borboletas tem sido o principal grupo de insetos em estudos sobre interação planta-herbívoro (Thompson & Pellmyr, 1991). A maior parte dos estudos sobre preferência por diferentes plantas hospedeiras, a influência da planta hospedeira no desempenho, a evolução da amplitude de hospedeiros, e a co-evolução entre herbívoros e plantas hospedeiras foi realizada nesse grupo (Ehrlich & Raven, 1964; Thompson & Pellmyr, 1991; Janz et al., 2006). Dentre as borboletas, a tribo Heliconiini e suas plantas hospedeiras da família Passifloraceae estão entre os organismos mais estudados a esse respeito (Benson et al., 1975). Além da grande quantidade de dados acumulados nessa tribo sobre as interações com as plantas hospedeiras, o gênero *Heliconius* Kluk, 1802 tem sido amplamente utilizado como modelo em estudos evolutivos, principalmente na compreensão de padrões de coloração nas asas no contexto de anéis miméticos (Brower, 1996), especiação (Jiggins, 2008 e referências inclusas) e biologia evolutiva do desenvolvimento (*evo-devo*) (McMillan et al., 2002; Joron et al., 2006; Parchem et al., 2007). Estudos sobre a forma da asa e assimetria, principalmente no contexto de uso de plantas hospedeiras não foram realizados até o momento, e permitiriam uma integração entre os campos de pesquisa que utilizam *Heliconius* como modelo. Esse tipo de integração contribuiria tanto para a compreensão de aspectos do desenvolvimento

interferindo na interação com plantas hospedeiras como, reciprocamente, permitiria uma melhor compreensão da influência de diferentes ambientes sobre o desenvolvimento.

Heliconius erato (Linnaeus, 1764) é uma das espécies melhor estudadas dentro do gênero, e a com distribuição geográfica mais ampla, ocorrendo do sul do México, por toda a América Central e a maior parte da América do Sul (Brown, 1979, 1981). Ela apresenta várias subespécies geográficas, com grandes diferenças no padrão de coloração, e em que a maioria das subespécies apresenta mimetismo Müllleriano com subespécies de *Heliconius melpomene* (Linnaeus, 1758). Além disso, cada subespécie é localmente mimetizada por várias espécies mímicas (McMillan et al., 2002). Nas regiões a sul da floresta Amazônica, a subespécie é *H. erato phyllis*, que é abundante em diferentes biomas e utiliza uma gama de plantas hospedeiras do gênero *Passiflora* em toda a sua distribuição (Ramos & Freitas, 1999). Diversos estudos investigaram o padrão de uso de plantas hospedeiras, a preferência dos adultos e o desempenho dessa subespécie no campo e sob condições de laboratório em populações do sul e sudeste do Brasil (Menna-Barreto & Araujo, 1985; Perico & Araujo, 1991; Rodrigues & Moreira, 1999, 2002, 2004; Ramos et al. submetido), mostrando que *H. erato* é altamente seletiva no processo de oviposição. Além de selecionar a espécie de hospedeira, ela também prefere ovipositar em regiões apicais intactas (Mugrabi-Oliveira & Moreira, 1996a), em plantas ricas em nitrogênio (Kerpel et al., 2006), e sem a presença de ovos de co-específicos (Williams & Gilbert, 1981; Mugrabi-Oliveira & Moreira 1996b). Essas características ecológicas e o conhecimento já disponível fazem dessa espécie um modelo ideal para o estudo da influência da planta hospedeira sobre o fenótipo, especialmente a forma da asa e a assimetria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Backwell, P. R. Y., Matsumasa, M., Double, M., Roberts, A., Murai, M., Keogh, J. S. & Jennions, M. D. 2007. What are the consequences of being left-clawed in a predominantly right-clawed fiddler crab? *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**: 2723-2729.
- Baylac, M. (2007) Rmorph: a morphometric library for R. pp. Available from the author: baylac@mnhn.fr.
- Benson, W. W., Brown, K. S. & Gilbert, L. E. 1975. Coevolution of plants and herbivores - passion flower butterflies. *Evolution* **29**: 659-680.
- Bernays, E. A. & Chapman, R. F. 1994. *Host-plant selection by phytophagous insects*. Chapman & Hall, New York.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bookstein, F. L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology* **58**: 313-365.
- Braendle, C. & Flatt, T. 2006. A role for genetic accommodation in evolution? *Bioessays* **28**: 868-873.
- Brower, A. V. Z. 1996. Parallel race formation and the evolution of mimicry in Heliconius butterflies: A phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* **50**: 195-221.
- Brown, K. S. 1979. Ecologia geográfica e evolução nas florestas neotropicais. Vol. Livredocência. pp. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.
- Brown, K. S. 1981. The biology of heliconius and related genera. *Annual Review of Entomology* **26**: 427-456.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection*. Murray, London.
- Dongen, S. V. 2006. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary

- biology: past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 1727-1743.
- Dryden, I. L. & Mardia, K. V. 1998. *Statistical shape analysis*. John Wiley & Sons, New York.
- Ehrlich, P. R. & Raven, P. H. 1964. Butterflies and plants - a study in coevolution. *Evolution* **18**: 586-608.
- Gibert, P., Moreteau, B., David, J. R., & Scheiner, S. M. 1998. Describing the evolution of reaction norm shape: body pigmentation in *Drosophila*. *Evolution* **52**:1501–1506.
- Gotthard, K. & Nylin, S. 1995. Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation - a selective review of plasticity in animal morphology and life-history. *Oikos* **74**: 3-17.
- Janz, N., Nylin, S. & Wahlberg, N. 2006. Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects. *Bmc Evolutionary Biology* **6**.
- Jiggins, C. D. 2008. Ecological speciation in mimetic butterflies. *Bioscience* **58**: 541-548.
- Joron, M., Jiggins, C. D., Papanicolaou, A. & McMillan, W. O. 2006. Heliconius wing patterns: an evo-devo model for understanding phenotypic diversity. *Heredity* **97**: 157-167.
- Kerpel, S. M., Soprano, E. & Moreira, G. R. P. 2006. Effect of nitrogen on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae) and consequences for larval performance and oviposition in *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera : nymphalidae). *Neotropical Entomology* **35**: 192-200.
- Klingenberg, C. P. & McIntyre, G. S. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: Analyzing patterns of fluctuating asymmetry with procrustes methods. *Evolution* **52**: 1363-1375.
- Lens, L., Van Dongen, S., Kark, S. & Matthysen, E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biological Reviews* **77**: 27-38.
- McMillan, W. O., Monteiro, A. & Kapan, D. D. 2002. Development and evolution on the

wing. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 125-133.

Menna-Barreto, Y. & Araujo, A. M. 1985. Evidence for host plant preferences in *Heliconius erato phyllis* from sothern Brazil (Nymphalidae). *Journal of Research on the Lepidoptera* **24**: 41-46.

Mitteroecker, P. & Gunz, P. 2009. Advances in Geometric Morphometrics. *Evolutionary Biology* **36**:235-247.

Monteiro, L.R. & Reis, S.F. 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. São Paulo, Holos. 188p.

Mugrabi-Oliveira & Moreira, 1996a Size of and damage of shoots of *Passiflora suberosa* (Passifloraceae) influence oviposition site selection of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 13, p. 939-953, 1996.

Mugrabi-Oliveira & Moreira, 1996b Conspecific mimics and low host plant availability reduce egg laying by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 13, p. 929-937, 1996.

Nylin, S. & Janz, N. 2009. Butterfly host plant range: an example of plasticity as a promoter of speciation? *Evolutionary Ecology* **23**: 137-146.

Oliveira, P. S. & Freitas, A. V. L. 2004. Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften* **91**: 557-570.

Palmer, A. R. & Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry - measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**: 391-421.

Parchem, R. J., Perry, M. W. & Patel, N. H. 2007. Patterns on the insect wing. *Current Opinion in Genetics & Development* **17**: 300-308.

Perico, E. & Araujo, A. M. 1991. Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Evolución Biológica* **5**: 59-71.

Pigliucci, M. 2001. *Phenotypic plasticity: Beyond nature and nurture*. The John's Hopkins

University Press, Baltimore.

- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 481-486.
- Pigliucci, M., Murren, C. J. & Schlichting, C. D. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology* **209**: 2362-2367.
- Price, P. W. 2002. Resource-driven terrestrial interaction webs. *Ecological Research* **17**: 241-247.
- Ramos, R. R. & Freitas, A. V. L. 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterist's Society* **53**: 11-21
- Ramos, R. R., Rodrigues, D. & Freitas, A. V. L. submitted. Positive relationships between oviposition and larval performance in a *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconinae) population from southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*.
- Rocha, F., Medeiros, H. F. & Klaczko, L. B. 2009. The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. *Evolution* **63**: 280-287.
- Rodrigues, D. & Moreira, G. R. P. 1999. Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep.: Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. *Journal of the lepidopterists' society* **53**: 321-332.
- Rodrigues, D. & Moreira, G. R. P. 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera:Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Brazilian journal of Biology* **62**: 108-113.
- Rodrigues, D. & Moreira, G. R. P. 2004. Seasonal variation in larval host plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera : Nymphalidae) adult body size. *Austral Ecology* **29**: 437-445.

- Rohlf, F. J. & Marcus, L. F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution* **8**: 129-132.
- Thompson, J. N. & Pellmyr, O. 1991. Evolution of oviposition behavior and host preference in lepidoptera. *Annual Review of Entomology* **36**: 65-89.
- Van Valen, L. 1962. Study of fluctuating asymmetry. *Evolution* **16**: 125-142
- Waddington, C. H. 1953. Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* **7**: 118-126.
- West, S. A. & Cunningham, J. P. 2002. A general model for host plant selection in phytophagous insects. *Journal of Theoretical Biology* **214**: 499-513.
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental plasticity and evolution*, 1 ed. Oxford University Press, New York.
- Williams, K. S. & Gilbert, L. E. 1981. Insects as selective agents on plant vegetative morphology - egg mimicry reduces egg-laying by butterflies. *Science* **212**: 467-469.

CAPÍTULO 1: Host-plant dependent wing morphometric variation in the butterfly *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae)

Leonardo Ré-Jorge, Pedro Cordeiro-Estrela, Louis B. Klaczko, Gilson R. P. Moreira & André V. L. Freitas

INTRODUCTION

Morphological variation in size and shape has been considered a key factor in evolutionary studies since their beginning (Darwin, 1859). When considering this kind of variation at the intraspecific level, the influence of genetic and environmental factors is a major concern. The framework of phenotypic plasticity and reaction norms, although relatively neglected until the 1980s, is essential to the understanding of the development and maintenance of size and shape variation (Pigliucci, 2005). Recently, it has been suggested that plasticity may even have a more primary role than genetic mutations in the origin of evolutionary novelties (West-Eberhard, 2003). In this context, the interaction between herbivorous insects and their host-plants is a very adequate model to study the influence of the biotic environment on an organism's phenotype.

In many cases the host-plant is the only feeding resource during larval development, with a potential variation in nutritional quality and presence of diverse chemical compounds influencing the development. In addition, the host-plant is the main factor modulating the interactions with other species, such as predators, parasites and pathogens (Nylin & Janz, 2009). Given these primary roles, it is expected that plants play a direct influence in different dimensions of an insect's phenotype, from life-history traits directly related to performance (Thompson, 1988), as mortality, body size and development time, to more subtle morphological variation not necessarily associated to

fitness. The former traits are expected to be optimized in primary hosts by means of adaptation, as a part of the process of host-plant colonization (Nylin & Gotthard, 1998). Inadequate development, and therefore higher variation in these traits are expected only for secondary hosts or in the case of generalist species. In contrast, subtle morphological variation can be considered as a reliable surrogate of the effects that different environments have on the developmental process since they are less related to fitness, and therefore subject to weaker selection. This makes the herbivore-plant interactions valuable for studying phenotypic plasticity and developmental accommodation.

The degree of fluctuating asymmetry (FA) in bilateral traits is frequently used as an index of the degree of environmental perturbation or stress, and of overall individual quality, and is defined as random nondirectional deviations from bilateral symmetry (Van Valen, 1962). This measure has long been taken for granted as a good measure of developmental instability, given that the capacity to make the two sides of the body with accuracy is an intuitive idea of what should comprise the level of stability and repeatability of the developmental process (Van Valen, 1962; Dongen, 2006). Nevertheless, recent studies have raised several objections to the suitability of FA as a measure of developmental instability and stress in populations (*e. g.* Lens et al., 2002). The main points are the low power of FA as an estimator of developmental instability and the possibility of different kinds of asymmetry (directional asymmetry and antisymmetry) interfering and masking FA.

Although statistical methods to sort out the effects of other kinds of asymmetry have been developed, mainly to separate FA and directional asymmetry (DA) (Palmer & Strobeck, 1986), the accuracy of FA is further reduced when more than one type of asymmetry occurs. This technique of partitioning the kinds of asymmetry has, on the other side, the advantage of also allowing the study of DA, which is the presence in a population of a consistent directional difference between left and right sides in supposedly

symmetrical morphologic structures (Van Valen, 1962). This trait in particular has had increased interest, as it supposedly has a strong genetic basis, but does not respond to artificial selection, and it is generally difficult to assign an adaptive role to it (Pelabon & Hansen, 2008).

Butterflies are the major model for the study of the interaction between herbivorous insects and their host-plants (Thompson & Pellmyr, 1991). Most studies on preference and performance, the evolution of host range and co-evolution have been carried out using this group (Ehrlich & Raven, 1964, Thompson & Pellmyr, 1991, Janz et al., 2006). Within butterflies, the tribe Heliconiini and its host-plants, the passion-vines (Passifloraceae), are amongst the most studied organisms in this regard (Benson et al., 1975; Brown 1981). Besides the large amount of data on interactions with host-plants, the genus *Heliconius* has been largely used as a model in evolutionary research, mainly in the comprehension of wing colour patterns (Brower, 1996, Gilbert, 2003), speciation (Jiggins, 2008) and evo-devo (McMillan et al., 2002, Joron et al., 2006, Parchem et al., 2007). Studies on wing shape and asymmetry, especially in the context of host-plant use were not held yet, and could integrate these fields of research using *Heliconius* as a model, contributing both to the comprehension of the developmental aspects of its interaction with hosts, and to a better understanding of the influence of different environments on development.

Butterfly wings consist of very appropriate structures for morphological studies, as they are related with multiple functions in life history, ranging from the flight activity and thermoregulation to conspecific recognition and signaling to predators. Insect wings are also among the most amenable traits for studies in geometric morphometrics, as they have a two dimensional nature and a venation system that allows the determination of type one landmarks (*sensu* Bookstein, 1991). Being two-dimensional, wings are not subject to the artifacts and deformations caused by the projection of a three dimensional structure in two

dimensions. They also have an abundance of veins, which are homologous – sometimes in large groups of species – and can have their position easily observed in images.

Heliconius erato is one of the best studied species of this genus, as well as the most widespread, occurring from south Mexico to southern South America (Brown, 1979, 1981). It presents several geographical subspecies, all involved in local mimicry rings with *Heliconius melpomene* and other butterfly species (McMillan et al., 2002). The extra-Amazonian subspecies, *H. erato phyllis*, is the most widespread, occurring in several different biomes, and using a wide range of host-plants of the genus *Passiflora* (Brown & Mielke, 1972; Ramos & Freitas, 1999). Previous studies have shown that *H. erato phyllis* is highly selective with respect to oviposition sites, concerning plant parts and species, nitrogen content and presence of conspecifics (Williams & Gilbert, 1981; Mugarib-Oliveira & Moreira, 1996; Rodrigues & Moreira, 1999, 2002; Kerpel et al., 2006). These ecological characteristics and the current knowledge on *H. erato phyllis* make it an appropriate model for studying the influence of the host-plant in the phenotype, especially wing shape and asymmetry.

In this study, we aim to investigate the host-plant influence on the development of *H. erato phyllis*, examining the variation in wing size, shape and asymmetry. Specifically, we ask three main questions: 1) Do shape and size differences among individuals arise on different host-plants? Our expectation is that the host-plants represent environments different enough to exert an influence in the development, causing variations in the form of individuals to make them significantly distinguishable. 2) Is there variation in the developmental instability among individuals reared on different host-plants? If fluctuating asymmetry is a good indicator of developmental stress, we expect to observe a relation among fluctuating asymmetry, performance and use, with a higher FA in individuals reared in plants that cause a high mortality and/or small size, and an avoidance of these host-plants for oviposition. 3) Is there directional asymmetry in this species? The necessity to

study other kinds of asymmetry allows us to investigate the presence of this phenomenon, which is self interesting and with uncertain adaptive significance.

MATERIAL AND METHODS

Study sites and butterfly rearing

We reared individuals from eggs laid by females collected in two populations located in two different regions, where host-plant use and performance had been previously investigated in detail: the first population was from southern Brazil, Rio Grande do Sul State, a temperate region in the southern limit of *H. erato* distribution (RS population hereafter). Females for oviposition were collected in Morro Santana, Porto Alegre Municipality. The second population was from southeastern Brazil, São Paulo State, in a tropical coastal region with high levels of humidity (SP population hereafter). Females were collected at Morro do Voturuá, São Vicente Municipality. Details of each region can be found in Rodrigues & Moreira (2002) and Ramos & Freitas (1999) respectively.

All individuals used in the present study were kindly provided by RR Ramos and A Elpino-Campos (butterflies from SP and RS populations, respectively), who have reared them for performance and behavioral studies (Ramos et al., submitted; A. Elpino-Campos, UFRGS, unpublished data) under the same controlled conditions. Eggs were collected daily from females kept in insectaries and taken to a climate room at 25 °C. They were kept in petri dishes lined with moistened paper until eclosion. First instars were then transferred individually to shoot tips of one of the following host-plants: *Passiflora capsularis*, *P. edulis* and *Passiflora jileki* in SP, and *Passiflora misera*, *Passiflora suberosa*, *Passiflora caerulea* and *P. edulis* in RS, and fed *ad libitum* until pupation. After

emergence, all the individuals were killed by freezing, then dried and kept in entomological envelopes until the image capture procedure.

Data acquisition and morphometrics

We removed the forewings of all individuals (43 from SP and 71 from RS) and captured images in 1200 dpi resolution of their ventral side, using a flatbed scanner (HP Scanjet 3800™). The ventral side was chosen because the veins are more visible on this surface. A total of 19 landmarks, vein intersections or vein tips, were scored in each wing (Fig. 1a) using TPSDig 2.1 (Rohlf, 2006). Both forewings of each individual were scored twice to account for measurement error in the asymmetry study. To score the landmarks in both forewings without any laterality bias, all images were also reversed to their mirror images, so that we scored the landmarks in the left wings in the images with the original orientation and for the right wings we used the reversed images. By doing that, left and right wings had the same orientation *a priori*, and it was not necessary to reverse the landmark configurations prior to superimposition.

We decomposed the form of all the landmark configurations into shape and size by means of geometric morphometrics (Bookstein, 1991, 1996, Dryden & Mardia, 1998). Size is measured as centroid size (CS), the square root of the sum of the squared distances of each landmark from the centroid, or gravity center, of the landmark configuration. To measure shape, all configurations were scaled to unit CS, and superimposed by a generalized least squares (GLS) Procrustes procedure. A mean shape is calculated and the differences between its landmarks and the ones of each individuals are the residuals of the GLS procedure. We used as shape variables the axes of a Principal Components Analysis (PCA) on the covariance matrix of these GLS residuals. The four last axes are null, given the dimensionality lost in the procrustes superimposition, so they were not

considered. The procedure described above was carried out in two different analyses: one including the two replications of both wings of all the individuals and another in which the replications' coordinates were averaged prior to superimposition. The superimposition in which the replications were averaged was used in all the subsequent analyses, with exception to the tests for asymmetry.

Size and Shape variation

We held some preliminary analyses to test for the existence of differences in shape and size between sexes to validate subsequent analysis. Otherwise, sexual dimorphism could mask the variation among individuals reared on the host-plants above mentioned. We carried out a one-way ANOVA for CS and a MANOVA for the 34 PCA axes, both using sex as the factor, to test for size and shape differences, respectively.

To test for host-plant dependent variation in size, we performed a one-way ANOVA for CS, with host-plant as the factor, with individuals from different localities reared on *P. edulis* as different levels. We made this separation in all tests in which host-plant variation was considered. For shape variation, as there was sexual dimorphism (see Results), we carried a two-way MANOVA for the 34 PCA axes with sex and host-plant as factors.

To test for the capacity to discriminate *H. erato phyllis* individuals reared on different host-plants based only on forewing size and shape, we calculated an optimal linear discriminant function between the seven host-plants (again, separating *P. edulis* from SP and RS). To do so, we performed an LDA on the 34 PCs, in combination with the CS. We used a leave-one-out cross-validation procedure that allows an unbiased estimate of classification percentages (Baylac et al., 2003). Cross-validation was used to evaluate the performance of classification by LDA. In the leave-one-out cross-validation, all the data except one individual are used to calculate the discriminant function. The individual not

used is then classified according to this function. The procedure is repeated to compute a mean classification error and a probability of group membership for each individual.

Asymmetry study

We followed the statistical design proposed by Klingenberg & McIntyre (1998) to partition the components of asymmetrical variation between directional asymmetry (DA) and fluctuating asymmetry (FA), for both size and shape. To assess the asymmetry of size, we performed an ANOVA for CS with side as a fixed effect and individual as a random one, nested in host-plant. The effect of host-plants detects size variation among host-plants, the “individual” factor is for individual variation in size, the “side” effect stands for DA and the interaction term between “side” and “individual” measures FA. As the effect of individuals was nested within the host-plant, the “individual” factor mean square was used as the error term for the host-plant effect F-ratio. For the “individual” and “side” effects we used the individual x side interaction mean squares as the error term, and for the individual x side effect, we used the measurement error.

To obtain a better characterization of the size asymmetry, we calculated the signed differences between the averaged CS measures of the right and left wings (R-L) as an index of DA. To evaluate FA, we used the module of this difference subtracted by the mean DA of each host-plant. To test for variation in FA among individuals from different host-plants, we carried an ANCOVA with host-plant as fixed factor and mean CS as covariate, to control for size-dependent FA.

For the shape asymmetry we performed a Procrustes ANOVA on the residuals of the superimposition in which all the replications were superimposed, with the same factor structure and F-ratio calculation of the ANOVA for CS. The sum of squares used in the test were obtained by adding the sums of squares of each of the coordinates. The

corresponding degrees of freedom were obtained by multiplying the ordinary number of degrees of freedom in the ANOVA design by the true number of dimensions in the data after the superimposition, that is, two times the number of landmarks minus four, given the translation, rotation and scaling of the configurations. To test for variation in the shape FA of individuals reared in the different host-plants, we followed the procedure proposed by Soto et al. (2008a): we carried out separate ANOVAs to detect the FA in each of the host-plants, and then compared the mean squares of the individual x side interaction factor of all the pairs of host-plants by means of F-tests. In our case, we applied a Bonferroni correction to account for the multiple comparisons.

All morphometric and statistical analyses were performed with 'R': a language and environment for statistical computing version 2.8 for Windows (R Development Core Team, 2008); morphometric procedures were done using the Rmorph library for R (Baylac, 2007).

RESULTS

Shape and size variation

Concerning sexual differences, we found no dimorphism in size ($F_{1,111} = 0.017$, $p = 0.90$), but a strong difference in shape between the sexes (Pillai = 0.799, $F_{34,xxx} = 9.14$, $p < 0.0001$, Fig. 1b). Given this difference, we used sex as a factor in the MANOVA testing for shape variation among individuals reared on different hosts, but not for the ANOVA testing for size variation.

There was significant size ($F_{6,106} = 14.11$, $p < 0.0001$) and shape (Table 1) variation among individuals reared on the different host-plant species. The absence of interaction between sex and host-plant for the shape allowed discriminant and asymmetry analysis to be done not considering sex. The smallest individuals were those reared on *P. jileki*, and

the largest ones were fed with *P. edulis*, *P. misera* and *P. suberosa* (Fig. 2). In Fig. 3, we plotted the mean value of the individuals grown in each of the host-plants for the first two axes of the PCA for the shape variables. These axes accounted for more than 44% of the total shape variation. As it shows the deformations along each axis of the PCA, this figure allows the visualization of what were the general wing deformations caused by feeding on different diets.

The linear discriminant analysis among individuals reared on each host-plant provided a considerable rate of discrimination, with 51% of the individuals being assigned to the host-plant on which they were reared. There was some variation in the correct classification rate, with a success as high as 75% in one of the species while others were much lower than this (Table 2). Although, even the host-plants with least success had a higher correct classification than the expected by chance. This analysis also allowed us to build a dendrogram (Fig. 4) from the Mahalanobis distances among the individuals reared on each host, showing a strong similarity between individuals fed on *P. misera* and *P. suberosa* and the absence of a geographical pattern in the shape variation.

Asymmetry

Basic descriptive statistics for the size asymmetry is shown on Table 3. We observed a very significant degree of asymmetry in the wings, with both DA and FA detected for size and for shape (Table 4). Left wings were consistently larger in individuals reared on all host-plants, with a 1.28% larger CS on average. As shown in Figure 1c, shape DA made right wings rounder than left wings. After the correction for DA, we did not detect differences in the degree of FA in the size of individuals reared on each of the host-plants ($F_{6,105} = 1.09$, $p = 0.37$). For the shape FA, we detected differences between the host-plants (Fig. 5). The individuals reared on *P. edulis* from SP showed a significantly

larger FA, when compared to those reared on other host-plants. Such an increase in FA was not observed for the individuals reared on the same host-plant species in RS.

DISCUSSION

Our study shows that wing shape is consistently influenced by the larval food source in *Heliconius erato phyllis*. To our knowledge, this is the first demonstration that larval diet influences the shape of structures in a butterfly. Our results are in agreement with other works that have detected this kind of host-related phenotypic plasticity in the carob moth and in cactophilic *Drosophila* (Mozaffarian et al., 2007; Soto et al., 2008b). The shape variation provided a high level of discrimination among individuals reared on different host-plants. We also found a very consistent directional asymmetry, a poorly studied phenomenon, but increasingly often detected in different systems (Pelabon & Hansen, 2008). The results of fluctuating asymmetry, on the other hand, showed no clear pattern which make our findings more difficult to interpret. In the following paragraphs we will discuss the main implications of these results for the ecology of *Heliconius* and for the study of phenotypic plasticity and asymmetry as a whole.

As observed in previous studies (Ramos & Freitas, 1999), we did not detect size dimorphism in *H. erato phyllis*. On the other hand, we detected a clear sexual dimorphism in the wing shape which was already noticed in the field (AVLF pers. obs.), but not properly documented before. Although well defined, this kind of dimorphism is hard to explain from an adaptive perspective. There are two main problems hindering the interpretation of this kind of wing shape variation in butterflies. First, the relation between subtle variations in wing shape and aerodynamics or flight performance is poorly understood. In the studies addressing this problem, shape is treated from a different framework, which considers shape in a univariate way, generally in terms of aspect ratio or centroid position (Srygley, 1994, 1999). The second problem is the intrinsically

multifunctional biological role of the wings in butterflies. Besides acting in flight, they may also function as cues for predators in the case of aposematic or cryptic species, and are generally involved in species recognition by sexual partners, and in thermoregulation (Srygley, 1994; Estrada & Jiggins, 2008). Given that all these aspects of the life history can vary according to sex, it is even more difficult to determine the relationship between wing shape differences and one specific aspect of wing function. Although, the influence of wing shape in the colour patterns used in species recognition by females should be further investigated, as the first hypothesis to be tested in cases of sexual dimorphism is its role in sexual selection.

Concerning the size variation observed among the individuals reared on the different host-plants, our results allow a comparison between previous studies on preference and performance carried out in the localities where the butterflies were collected. Ramos et al (submitted) measured host-plant use, preference under insectary conditions and the survivorship of the individuals from SP used in this study, and similar data for use and survival is available for *H. erato* reared in the host-plants from RS (Menna-Barreto & Araujo, 1985; Rodrigues & Moreira, 2002). This information, added to our results on size and FA, allows a general understanding of the forces driving host-plant selection in *H. erato phyllis*. The host-plants most used in the field in both localities (*P. capsularis* and *P. edulis* in SP and *P. misera* and *P. suberosa* in RS) provide the highest survivorship and size. The same occurs with respect to the oviposition preference under insectary conditions (Menna-Barreto & Araujo, 1985; Ramos et al., *in press.*), with the exception of individuals reared on *P. edulis* in RS. In this region, there are no reports of *H. erato phyllis* use of *P. edulis* in the field, as in the populations with host-plant use assessed this host-plant is absent (Rodrigues & Moreira, 2002). The absence of an effective use of this host could explain the observed pattern, with very low survival but large size in the RS population. Additionally it corroborates the existence of local

specializations, as in SP *P. edulis* provides *H. erato phyllis* both high survival and size, and is highly used in the field.

Shape variation

The wing shape variation among *H. erato phyllis* individuals reared on different host-plants is an example of morphological phenotypic plasticity that possibly is not adaptive in a strict sense, but accounts for a large proportion of the underlying variation observed among individuals. These results raise several questions about the origin and maintenance of such phenotypic plasticity.

The first pattern that arises is the relationship between phenotypic plasticity and geographical variation. As can be seen through the absence of shape differences among individuals reared in *P. edulis* from both localities, and the not separation of the localities in the dendrogram of Mahalanobis distances, *H. erato phyllis* wing shape does not vary geographically. This gives support for the existence of a strong role of phenotypic plasticity in this trait. These results differ from the observed for wing size, which shows a significant difference between individuals reared on *P. edulis* from RS and SP, as well as a general tendency to find larger individuals in RS. These individuals were reared under the same temperatures, thus plastic responses to climatic variation between the localities can be ruled out as the explanation of wing size variation. As a consequence, our work provides evidence that, at least in this system, geographical size variation is mainly the result of genetic differences, while most shape variation is the result of phenotypic plasticity. These conclusions are based on the assumption that *P. edulis* from both localities are nutritionally similar.

The next point to be addressed is the origin of the phenotypic plasticity in *H. erato phyllis* wing shape. While size variation in herbivorous species related to host-plants can

be directly attributed to nutritional quality (Nylín & Gotthard, 1998), this correlation is not straightforward for shape variation. Unlike the size, the shape of a given structure is not expected to be influenced by the quantity of nutrients provided, unless this shape variation has to do with static allometry (*sensu* Gould 1966). In this case, shape differences could be attributed to size differences resulting from starvation. However, this is not an issue here, as allometry is low (Fig 1d), and individuals reared on host-plants that provide a similar adult size are not necessarily more similar in shape (Fig 4). Besides, this variation is probably not advantageous at the adult stage, given that individuals reared on different host-plants available in the same environment will face the same selective pressures in the adult life (unless the host-plant does influence *a priori* the adult life history). Larval host plant cannot be considered a relevant part of the adult environment for most butterfly species, since a different food source is used, and especially in the case of *Heliconius*, that has a very long lifespan (Brown, 1981), and Hopkins Effect isn't an issue (Kerpel & Moreira, 2005). If wing shape phenotypic plasticity is not adaptive at the adult stage and is not directly influenced by the amount of nutrients available on each host plant, these differences are probably the result of qualitative nutritional differences and their effects on *H. erato phyllis* development. This variation can be explained as developmental accommodation to different environments (i.e. host plants) (Nylín & Janz, 2009, West-Eberhard, 2003). This kind of effect is expected to be widespread, mainly among species in which each individual uses a single food source during the development, but different individuals can use very different hosts. Although such variation is probably selectively neutral in most systems for most of the time, it represents a pool of morphological variation that cannot be neglected. Such reaction norms can be modulated by selective agents in contexts in which the host-plant used by the larva is ecologically relevant in the adult life. The occurrence of this kind of situation is feasible in nature and could trigger genetic accommodation in situations involving host range change, and subsequent diversification,

as proposed by Nylin & Janz (2009), based on the general ideas of genetic assimilation by Waddington (1953).

Our results on shape variation open several possibilities for future studies on the morphological variation among individuals and its relation to food source. First, the proximal causation of such plasticity could be investigated by identifying key chemical compounds acting on the determination of the shape variation present in the different host-plants. A second approach would be using this kind of data on shape variation in individuals reared under laboratory conditions to assign field collected ones from different host-plants. Two important issues to be addressed before the application of such an approach are the need for a high enough rate of correct classification and the necessity to assume that the main source of shape variation is the host-plant. In other words, it should be assured that the other sources of variation present under natural conditions do not interfere with the capacity of the discriminant function to correctly assign individuals to its host plant. In *H. erato phyllis* the rate of correct classification is 51%, so the expected success is average, but even this rate could be useful, given that it would give a general comprehension about the host-plant use in a given locality without the necessity of the arduous work of directly quantifying host-plant use. Afterwards, it would be necessary to validate this technique by assigning populations whose host-plant range is already known. A third approach would be comparing the morphological variation within species with different patterns of host-plant use in order to better understand the role of different factors in the morphological determination.

Asymmetry

The different performance outcomes recorded for *H. erato phyllis* on different host plant species isn't in agreement with our findings regarding fluctuating asymmetry. The absence of differences between the host-plants in size FA and the lack of a relation with

any of the performance parameters in the shape FA support the current criticism raised against FA as an index of stress and developmental instability (Dongen, 2006; Lens et al, 2002).

We observed a consistent directional asymmetry both for size and shape, with a higher effect than the observed for FA in both cases. Subtle directional asymmetry in supposedly symmetrical structures is generally considered to have a genetic basis, although its adaptive significance is uncertain (Pelabon & Hansen, 2008). In our study, the directional asymmetry was constant among different host-plants and among locations, indicating that it might have a genetic basis, and supports the idea proposed in the review above that it is constant at the species level. Future studies on DA using related species might bring light to the evolutionary dynamics of this character. Given that DA is generally strongly insensitive to artificial selection in most *taxa*, experimental work does not seem adequate to studying it. Interspecific comparisons are a possible approach in the study of this character, investigating whether it has phylogenetic inertia or whether it is more apparent under certain ecological conditions. *Heliconius* butterflies are a very suitable model for this kind of study, as there are many species with a well known phylogeny and several subspecies with high wing pattern differentiation. Besides, this group has been widely used for evolutionary developmental biology studies and, as a consequence, knowledge on wing developmental mechanisms are already available.

Conclusion

In conclusion, our work shows to what extent the environment can exert influences on the phenotype, from characteristics directly related to fitness to the most subtle morphological wing shape traits. We emphasize the prominent role of the host-plants as

the most important environmental factor in the ecology of herbivorous insects, and show that a large proportion of total morphological variation has an environmental origin.

We suggest that future studies on the patterns and dynamics of host-plant use be integrated with studies on morphological variation, given that phenotypic variation could be better understood if held in the framework of patterns of interaction structure. The separation between adaptive and intrinsic effects of different hosts would also have a deeper comprehension if other kinds of traits are considered in addition to performance parameters. This integrated approach would allow a better understanding and could offer a contribution to the solution of current problems both in ecology and evolutionary biology, such as the role of the environmental variation in diversification and speciation and the role of the interactions in diverse aspects of the life-history of organisms.

REFERENCES

- Baylac, M. (2007) Rmorph: a morphometric library for R. pp. Available from the author: baylac@mnhn.fr.
- Baylac, M., Villemant, C. & Simbolotti, G. 2003. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**: 89-98.
- Benson, W. W., Brown, K. S. & Gilbert, L. E. 1975. Coevolution of plants and herbivores - passion flower butterflies. *Evolution* **29**: 659-680.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bookstein, F. L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology* **58**: 313-365.
- Brower, A. V. Z. 1996. Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: A phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences.

- Evolution* **50**: 195-221.
- Brown, K. S. 1979. Ecologia geográfica e evolução nas florestas neotropicais. Vol. Livro-docência. pp. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.
- Brown, K. S. 1981. The biology of heliconius and related genera. *Annual Review of Entomology* **26**: 427-456.
- Brown, K. S. & Mielke, O. H. H. 1972. Heliconians of brazil (lepidoptera - nymphalidae) .2. introduction and general comments, with a supplementary revision of tribe. *Zoologica* **57**: 1-&.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection*. Murray, London.
- Dongen, S. V. 2006. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 1727-1743.
- Dryden, I. L. & Mardia, K. V. 1998. *Statistical shape analysis*. John Wiley & Sons, New York.
- Ehrlich, P. R. & Raven, P. H. 1964. Butterflies and plants - a study in coevolution. *Evolution* **18**: 586-608.
- Estrada, C. & Jiggins, C. D. 2008. Interspecific sexual attraction because of convergence in warning colouration: is there a conflict between natural and sexual selection in mimetic species? *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 749-760.
- Gilbert, L. G. 2003. Adaptive novelty through introgression in Heliconius wing patterns: Evidence for shared genetic tool box from synthetic hybrid zones. In: *Butterflies as Model Systems*, (Boggs, C. L., Ehrlich, P. R. & Watt, W. B., eds.). pp. University of Chicago Press.
- Janz, N., Nylin, S. & Wahlberg, N. 2006. Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects. *Bmc Evolutionary Biology* **6**: 10.
- Jiggins, C. D. 2008. Ecological speciation in mimetic butterflies. *Bioscience* **58**: 541-548.
- Joron, M., Jiggins, C. D., Papanicolaou, A. & McMillan, W. O. 2006. Heliconius wing

- patterns: an evo-devo model for understanding phenotypic diversity. *Heredity* **97**: 157-167.
- Kerpel, S. M. & Moreira, G. R. P. 2005. Absence of learning and local specialization on host plant selection by *Heliconius erato*. *Journal of Insect Behavior* **18**: 433-452.
- Kerpel, S. M., Soprano, E. & Moreira, G. R. P. 2006. Effect of nitrogen on *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae) and consequences for larval performance and oviposition in *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera : nymphalidae). *Neotropical Entomology* **35**: 192-200.
- Klingenberg, C. P. & McIntyre, G. S. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: Analyzing patterns of fluctuating asymmetry with procrustes methods. *Evolution* **52**: 1363-1375.
- Lens, L., Van Dongen, S., Kark, S. & Matthysen, E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? *Biological Reviews* **77**: 27-38.
- McMillan, W. O., Monteiro, A. & Kapan, D. D. 2002. Development and evolution on the wing. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 125-133.
- Menna-Barreto, Y. & Araujo, A. M. 1985. Evidence for host plant preferences in *Heliconius erato phyllis* from southern Brazil (Nymphalidae). *Journal of Research on the Lepidoptera* **24**: 6.
- Mozaffarian, F., Sarafrazi, A. & Ganbalani, G. N. 2007. Host plant-associated population variation in the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* in Iran: A geometric morphometric analysis suggests a nutritional basis. *Journal of Insect Science* **7**.
- Mugrabi-Oliveira, E. & Moreira, G. R. P. 1996. Conspecific mimics and low host plant availability reduce egg laying by *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* **13**: 929-937.
- Nylin, S. & Gotthard, K. 1998. Plasticity in life-history traits. *Annual Review of Entomology*

43: 63-83.

- Nylin, S. & Janz, N. 2009. Butterfly host plant range: an example of plasticity as a promoter of speciation? *Evolutionary Ecology* **23**: 137-146.
- Palmer, A. R. & Strobeck, C. 1986. Fluctuating asymmetry - measurement, analysis, patterns. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**: 391-421.
- Parchem, R. J., Perry, M. W. & Patel, N. H. 2007. Patterns on the insect wing. *Current Opinion in Genetics & Development* **17**: 300-308.
- Pelabon, C. & Hansen, T. F. 2008. On the adaptive accuracy of directional asymmetry in insect wing size. *Evolution* **62**: 2855-2867.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 481-486.
- R development Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing. pp. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ramos, R. R. & Freitas, A. V. L. 1999. Population biology and wing color variation in *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterist's Society* **53**: 11.
- Ramos, R. R., Rodrigues, D. & Freitas, A. V. L. in press. Positive relationships between oviposition and larval performance in a *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconinae) population from southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*.
- Rodrigues, D. & Moreira, G. R. P. 1999. Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep.: Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. *Journal of the lepidopterists' society* **53**: 6.
- Rodrigues, D. & Moreira, G. R. P. 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera:Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Brazilian journal of Biology* **62**: 108-113.

- Rohlf, F. J. (2006) TPSDig 2.10. pp., Stony Brook.
- Soto, I. M., Carreira, V. P., Soto, E. M. & Hasson, E. 2008a. Wing morphology and fluctuating asymmetry depend on the host plant in cactophilic *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 598-609.
- Soto, I. M., Hasson, E. R. & Manfrin, M. H. 2008b. Wing morphology is related to host plants in cactophilic *Drosophila gouveai* and *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **95**: 655-665.
- Srygley, R. B. 1994. Locomotor mimicry in butterflies - the associations of positions of centers of mass among groups of mimetic, unprofitable prey. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **343**: 145-155.
- Srygley, R. B. 1999. Locomotor mimicry in Heliconius butterflies: contrast analyses of flight morphology and kinematics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **354**: 203-214.
- Thompson, J. N. 1988. Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **47**: 3-14.
- Thompson, J. N. & Pellmyr, O. 1991. Evolution of oviposition behavior and host preference in lepidoptera. *Annual Review of Entomology* **36**: 65-89.
- Van Valen, L. 1962. Study of fluctuating asymmetry. *Evolution* **16**: 125-&.
- Waddington, C. H. 1953. Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution* **7**: 118-126.
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental plasticity and evolution*, 1 ed. Oxford University Press, New York.
- Williams, K. S. & Gilbert, L. E. 1981. Insects as selective agents on plant vegetative morphology - egg mimicry reduces egg-laying by butterflies. *Science* **212**: 467-469.

TABLES:

Table 1: MANOVA of the PCA on the shape variables testing for sexual and host-plant based differences in shape among *Heliconius erato phyllis* individuals. *** p<0.0001

	Df	Pillai	approx F	num Df	den Df	
Sex	1	0.829	9.4366	34	66	***
Host-Plant	6	3.098	2.2303	204	426	***
Sex x Host-Plant	6	1.898	0.9666	204	426	ns
Residual	99					

Table 2: Percentage of classification of the host-plant on which *Heliconius erato phyllis* larvae were reared based on shape and size by means of a linear discriminant analysis followed by leave-one-out cross-validation procedure.

	<i>P. edulis</i> - RS	<i>P. jileki</i>	<i>P. edulis</i> - SP	<i>P. capsularis</i>	<i>P. carulea</i>	<i>P. misera</i>	<i>P. suberosa</i>
<i>P. edulis</i> - RS	75	5	10	0	5	0	5
<i>P. jileki</i>	0	30.77	7.69	23.08	23.08	7.69	7.69
<i>P. edulis</i> - SP	12.5	12.5	37.5	6.25	12.5	18.75	0
<i>P. capsularis</i>	0	0	7.69	53.85	7.69	7.69	23.08
<i>P. carulea</i>	17.65	11.76	0	17.65	41.18	5.88	5.88
<i>P. misera</i>	0	0	0	0	5.88	58.82	35.29
<i>P. suberosa</i>	0	11.76	5.88	11.76	0	17.65	52.94

Table 3: Descriptive statistics of the analysis of wing asymmetry in *Heliconius erato phyllis* reared on different host-plants. Sizes and asymmetries are given with standard deviations, N= number of individuals, CV = coefficient of variation.

Host-plant	N	Mean wing size	Size CV	R - L wing size	Asymmetry CV
<i>P. carulea</i>	17	1996 ± 82.9	0.041	-28.88 ± 9.45	0.327
<i>P. capsularis</i>	13	2036 ± 110.8	0.054	-23.16 ± 9.41	0.406
<i>P. edulis</i> - RS	20	2156 ± 106.8	0.050	-28.48 ± 9.00	0.316
<i>P. edulis</i> - SP	16	2000 ± 162.0	0.081	-32.01 ± 29.02	0.907
<i>P. jileki</i>	13	1831 ± 145.3	0.079	-6.62 ± 30.96	4.678
<i>P. misera</i>	17	2125 ± 76.0	0.036	-30.81 ± 16.46	0.534
<i>P. suberosa</i>	17	2099 ± 92.1	0.044	-28.56 ± 13.83	0.484

Table 4: ANOVA and Procrustes ANOVA testing for directional and fluctuating asymmetry in the size and shape respectively in the wings of *Heliconius erato phyllis*. d. f. = degrees of freedom, MS = mean squares, *** p < 0.0001

	d.f.	MS	F	
Size				
Host-plant	6	760746	14.768	***
Individual	106	51514	137.738	***
Side	1	78033	208.644	***
Individual x Side	112	374	74.800	***
Error	226	5		
Shape				
Host-plant	204	3.32E-04	2.441	***
Individual	3604	1.36E-04	12.716	***
Side	34	5.67E-04	53.006	***
Individual x Side	3808	1.07E-05	10.387	***
Error	7684	1.03E-06		

FIGURES:

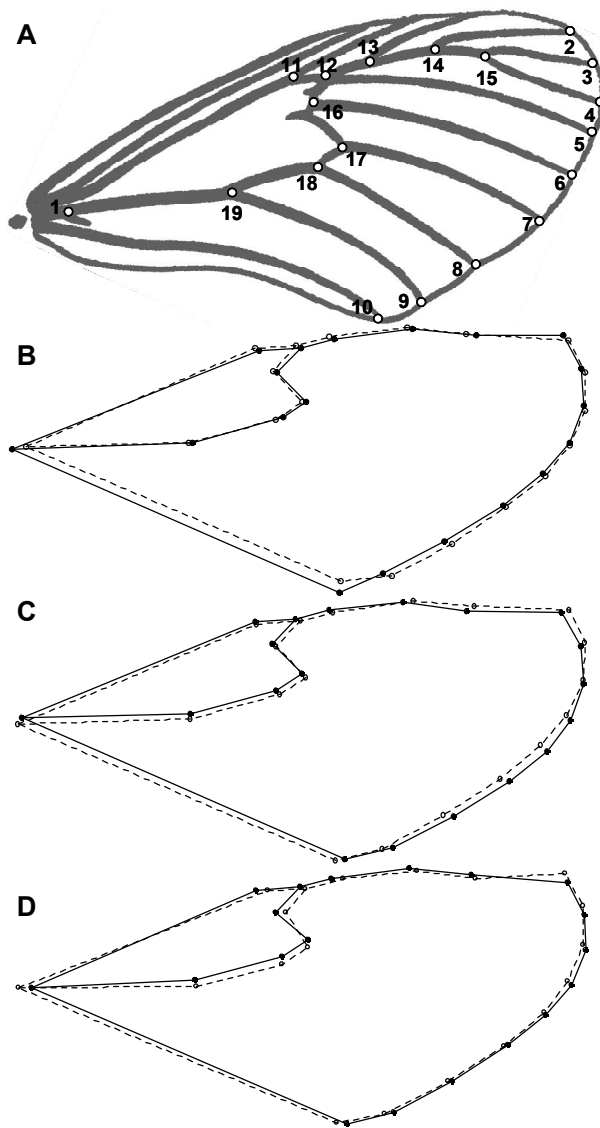


Fig. 1: Landmarks used in this study and the shape variation in *H. erato phyllis* forewings from sexual dimorphism, directional asymmetry and allometry obtained by multiple regression. (A) Ventral view of the left wing of a *Heliconius erato* butterfly. Open circles indicates the landmarks used in this study. (B) female (dashed line) and male (solid line) wing shape. (C) left (dashed line) and right (solid line) forewing and (D) small (dashed line) and large (solid line) individuals.

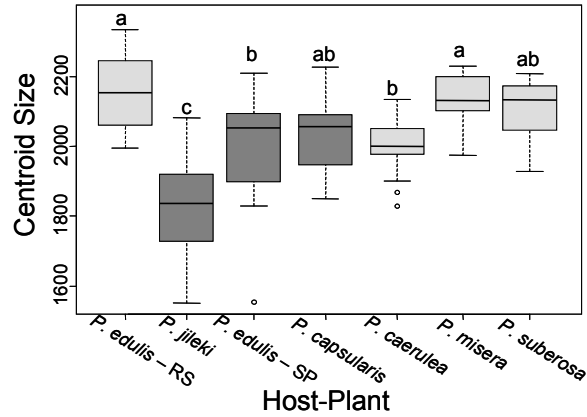


Fig. 2: Wing size variation among *H. erato phyllis* reared on different host-plants from different localities. Light grey boxes are from individuals from RS and dark grey are from SP. The host-plants are ordered by larval survival. Different letters above boxes represent significant differences among groups (Tukey multiple comparisons). Dots represent outliers for each host plant.

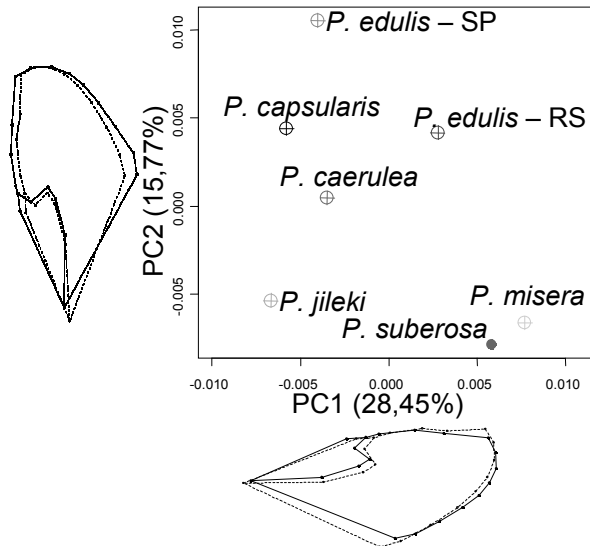


Fig. 3: Mean values on the two first axes of the PCA on shape residuals (percentage of shape variation described) of *Heliconius erato phyllis* individuals reared on different host-plant species. The shape variation along each axis is indicated by the picture next to each axis, in which the dashed line represents the individuals from low values in the axis and the solid line represents high values.

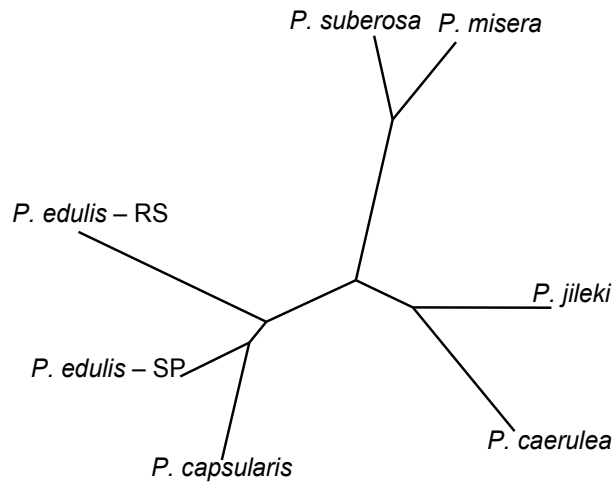


Fig. 4: Unrooted dendrogram of the malahanobis distances between *H. erato phyllis* reared on different host-plants.

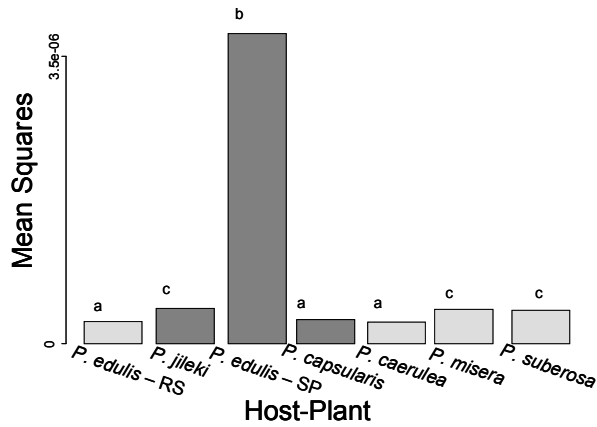


Fig. 5: Mean squares of the individual vs. side interaction factor of ANOVAs detecting fluctuating asymmetry in *Heliconius erato* individuals grown on different host-plants. Light grey bars are from individuals from RS and dark grey are from SP. The host-plants are ordered by larval survival.

CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho exemplifica o quanto o fenótipo pode ser influenciado pelo ambiente, desde características diretamente relacionadas ao desempenho individual até variações sutis na forma da asa em *Heliconius erato phyllis*. Observamos também uma assimetria direcional muito consistente e resultados controversos para assimetria flutuante. As principais conclusões do trabalho são:

- A variação em tamanho entre indivíduos criados em diferentes hospedeiras está de acordo com o uso, preferência e sobrevivência registrados na literatura para a maioria das hospedeiras. Há também uma tendência geográfica de tamanho, com indivíduos maiores no RS, inclusive quando se alimentando da mesma planta em ambos os locais (*Passiflora edulis*).
- A variação em forma observada entre indivíduos que se alimentaram de diferentes hospedeiras é o primeiro exemplo do gênero para borboletas, e um caso de plasticidade no desenvolvimento sem causa adaptativa aparente. O grau de discriminação observado entre esses indivíduos permite o desenvolvimento de técnicas de avaliação de uso de hospedeiras baseado na forma dos adultos, nos casos em que essa plasticidade ocorra.
- A assimetria direcional observada neste estudo, numa espécie modelo em estudos de biologia evolutiva do desenvolvimento, permite a realização de trabalhos sobre a dinâmica evolutiva dessa característica nas diversas subespécies de *Heliconius erato* e nas outras espécies do gênero.
- Não foi observada variação na assimetria flutuante no tamanho das asas de *H. erato phyllis* criados em diferentes hospedeiras, e os resultados para forma são pouco conclusivos, sem relação com parâmetros estimadores do desempenho. Esses resultados são consistentes com o atual descrédito dado à assimetria flutuante como indicador de estresse e aptidão.

- A principal contribuição desse trabalho é a demonstração de que o padrão de uso de hospedeiras e a variabilidade morfológica são dois parâmetros ecológicos interdependentes. Futuras pesquisas que busquem estudá-los de maneira integrada podem contribuir para a solução de problemas atuais em ecologia e em biologia evolutiva, como o papel da variação ambiental na diversificação e especiação e o papel das interações em diversos aspectos da história de vida dos organismos.