



Universidad del  
**Rosario**

**¿Es la coloración aposemática de las mariposas *Heliconius* una señal honesta de su toxicidad?**

Juan Pablo Ramírez Romero

Universidad del Rosario  
Programa de Biología  
Facultad de Ciencias Naturales  
Bogotá, Colombia  
2022

**¿Es la coloración aposemática de las mariposas *Heliconius* una señal honesta de su toxicidad?**

Juan Pablo Ramírez Romero

Tesis, presentada para obtener el título de:

**(Biólogo)**

Director

**Ph. D, Camilo Salazar**

Co-director

**Mag. Nicol Rueda**

Universidad del Rosario  
Programa de Biología  
Facultad de Ciencias Naturales  
Bogotá, Colombia  
2022

# ¿Es la coloración aposemática de las mariposas *Heliconius* una señal honesta de su toxicidad?

Juan Pablo Ramírez Romero<sup>1</sup>, Nicol Rueda<sup>1</sup> and Camilo Salazar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia

## Resumen

Los patrones de color en especies miméticas müllerianas están fuertemente relacionadas a la evolución de defensas químicas. Uno de los ejemplos clásicos de mimetismo son las mariposas *Heliconius* donde hay una alta variación geográfica de anillos miméticos. A pesar de la amplia investigación que hay sobre la coloración y la toxicidad de este grupo de mariposas, la relación entre ambos caracteres aún no ha sido estudiada y se desconoce si la señal de advertencia es cuantitativamente honesta. En este estudio se cuantificaron los compuestos cianogénicos y los contrastes de color de dos anillos miméticos bajo condiciones de luz y dos modelos de visión de las aves. La relación entre estas dos variables se evaluó por medio de la implementación de modelos lineales (lm). No se encontró correlación entre la coloración y la toxicidad, pero si entre esta última y las especies. Adicionalmente, se encontró variación entre los perfiles químicos de especies de un mismo anillo, así como también entre localidades geográficas. La limitación del recurso, las relaciones filogenéticas y otros factores adicionales podrían contribuir a explicar la asociación de la toxicidad a un mismo patrón de coloración.

## Abstract

Colour patterns in müllerian mimetic species are strongly related to the evolution of chemical defences. One of the classic examples of mimicry is the *Heliconius* butterflies, where there is a high geographic variation of mimetic rings. Despite extensive research on the colouration and toxicity of this group of butterflies, the relationship between these two traits is still understudied, and whether the warning signal is quantitatively honest is unknown. In this study, cyanogenic compounds and colour contrasts of two mimetic rings were quantified under different light

conditions and two models of bird vision. The correlation between these two variables was evaluated using linear models (lm). No correlation was found between colouration and toxicity, but there was a correlation between the latter and the species. In addition, variation was found between the chemical profiles of species in the same ring and between geographic locations. Other factors such as resource limitation (e.g. host plant) could explain the toxicity associated with the same colouration pattern.

### **Palabras clave/Keywords**

Mimetismo Mülleriano, contraste cromático y acromático, compuestos cianogénicos.

Müllerian mimicry, chromatic and achromatic contrast, cyanogenic compounds.

### **Introducción**

El aposematismo es uno de los fenómenos biológicos más interesantes en la naturaleza. Por medio de este las especies advierten a sus depredadores de la presencia de una defensa secundaria nociva a partir de una coloración llamativa (Summers et al., 2015; Briolat et al., 2018). A pesar de una larga historia de investigación sobre señales de advertencia de los animales, sigue sin resolverse si estas señales son cuantitativamente honestas (Briolat et al., 2018). Es decir, si el valor de la coloración refleja el nivel de defensa (toxicidad) de la especie (Summers et al., 2015). Este tipo de relación se espera que ocurra debido a que una coloración llamativa aumenta el costo o riesgo de detección de la presa, lo que en ausencia de defensas secundarias resultaría nocivo para la tasa de supervivencia de la misma (Lee et al., 2011). Aunque en algunos estudios no se ha encontrado evidencia de honestidad entre coloración y toxicidad (Briolat et al., 2018; Medina et al., 2019; Lee et al., 2011; Preißler et al., 2019; Stuckert et al., 2018), la correlación entre estas dos variables parece predominar en la naturaleza (White & Umbers, 2021). Algunos ejemplos de honestidad se han reportado en las mariposas *Danaus plexippus* (Blount et al., 2021), en las ranas *Dendrobates pumilio* (Maan & Cummings, 2012) y en opistobranquios marinos (Cortesi & Cheney, 2010).

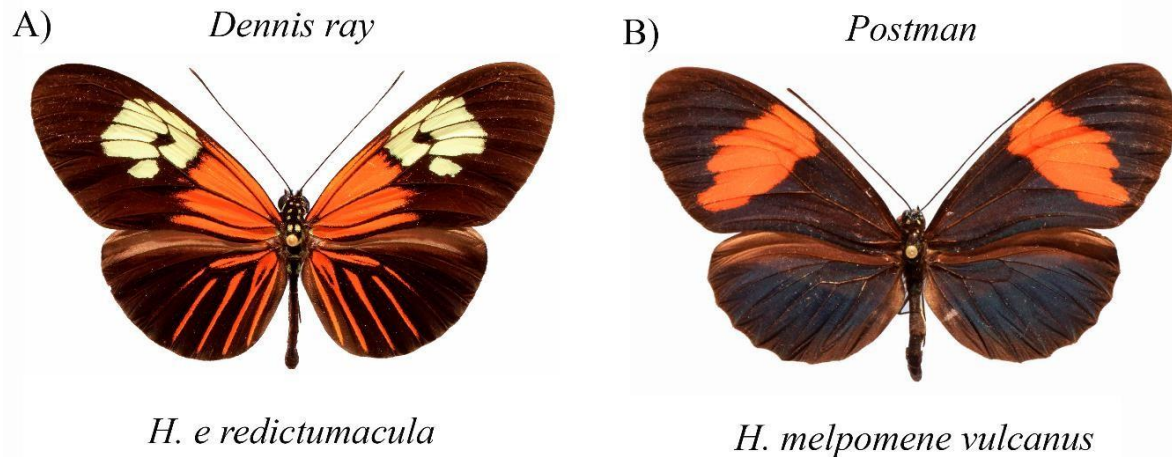
El género de mariposas *Heliconius* no solo presenta una coloración aposemática respaldada por toxinas, sino que además conforma múltiples anillos de mimetismo mulleriano (Kronforst & Papa, 2015, De Castro et al., 2019; Jiggins, 2017), donde distintas especies simpátricas comparten una misma señal de advertencia (Mattila et al., 2021; Jiggins, 2017). Este fenómeno biológico les

permite a las especies involucradas reducir el costo de “enseñanza” a los depredadores (Santos et al., 2003).

En cuanto a la toxicidad en estas mariposas, se ha evaluado la identidad, origen, distribución filogenética y variación dentro y entre anillos miméticos de los glicósidos cianogénicos (Arias et al., 2016; De Castro et al., 2019; Sculfort et al., 2020; Mattila et al., 2021). Con base en estos estudios se ha observado que existen diferencias significativas en los niveles y compuestos tóxicos entre y dentro de los anillos miméticos, evidenciando una alta variación en la concentración y composición de toxinas incluso dentro de un mismo anillo mimético (Arias et al., 2016; Sculfort et al., 2020; De Castro et al., 2019). Asimismo, factores ecológicos como la especialización en una planta huésped representa un aumento significativo en la concentración y la variación del perfil químico (De Castro et al., 2019). Adicionalmente, la variación geográfica de los anillos miméticos y la ancestría compartida contribuyen a la variación de los perfiles químicos (Sculfort et al., 2020). Es así como, en el clado *sara-sapho* prima la presencia de compuestos secuestrados, específicamente epivolquenina (De Castro et al., 2019).

Con respecto a la coloración, se ha estimado la capacidad de las aves de discriminar diferentes colores en algunas especies comiméticas encontrándose que las aves distinguen menos las diferencias entre contrastes del negro y el amarillo (Dell'Aglio et al., 2018). Por otro lado, se ha encontrado que las hembras de *H. erato* usan otro canal visual críptico sobre el mismo parche de coloración para distinguir sus conespecíficos. Esto implicaría un efecto de la selección sexual en la coloración por medio de canales crípticos de color evitando el conflicto de la señal natural y sexual (Dell'Aglio et al., 2019; Llaurens et al., 2014).

A pesar de la amplia investigación sobre estos temas en este grupo de mariposas, la asociación de la toxicidad con la coloración alar no ha sido estudiada. Por lo que, no es claro si la coloración es una señal cuantitativa honesta de la toxicidad, es decir, si especies más tóxicas son también más contrastantes para las aves. Por consiguiente, hemos planteado como objetivo principal de esta investigación determinar si el grado de toxicidad de los anillos miméticos *dennis-ray* y *postman* (ver figura 1) del género *Heliconius* se explica por el contraste de su coloración. Basados en el mimetismo Müllleriano, en este trabajo se espera que las especies pertenecientes a estos anillos muestren una señal cuantitativa honesta. Adicionalmente, se espera aportar a la discusión actual sobre la generalidad de que las coloraciones aposemáticas/miméticas sean señales honestas de toxicidad.



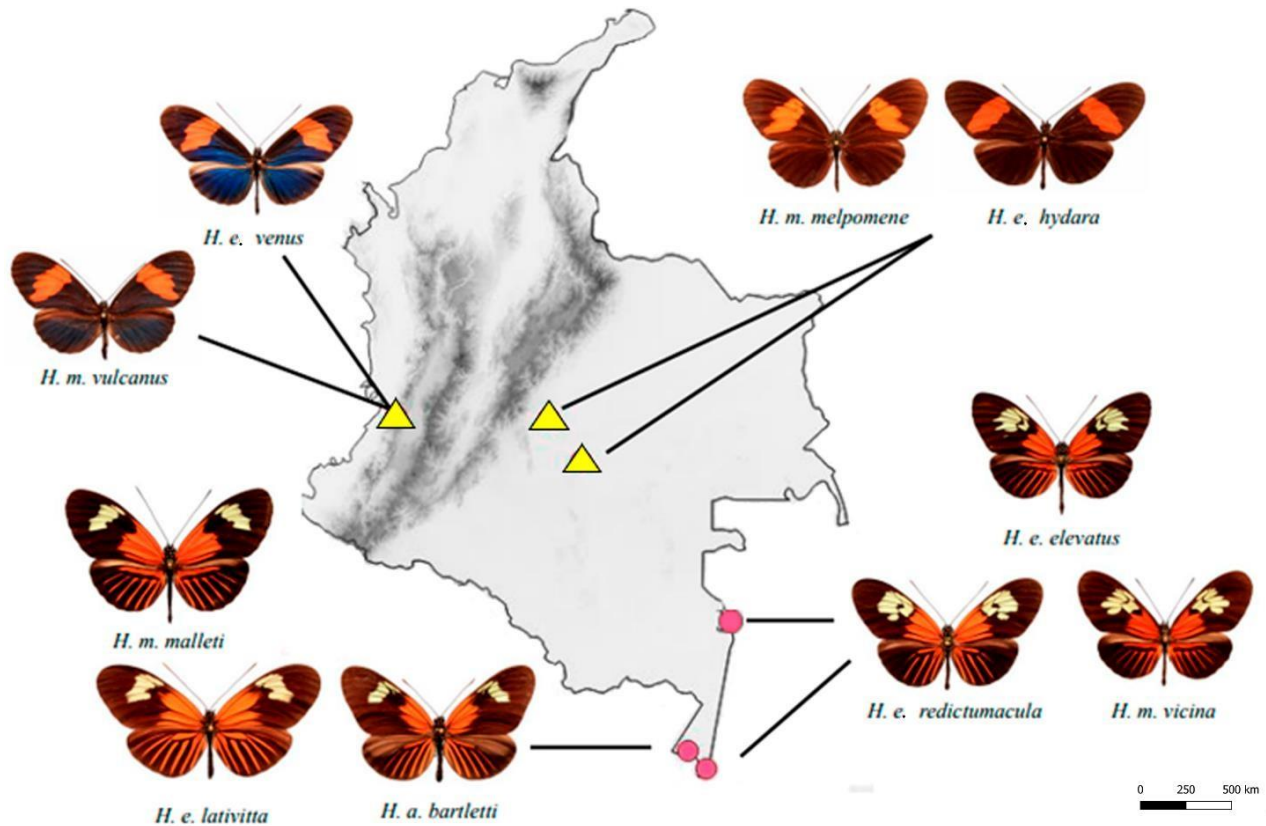
**Figura 1. Patrones de coloración evaluados en este estudio.** A) Ejemplar del patrón de coloración del anillo mimético *dennis-ray* (*H. e. reductumacula*) y B) del anillo mimético *postman* (*H. m. vulcanus*).

## Metodología

### Captura de especímenes

Se tomaron 6 zonas de muestreo. Las especies del anillo mimético *dennis-ray* se colectaron por medio de redes en la región amazónica colombiana, en los municipios de La Pedrera y Puerto Nariño (2 zonas muy cercanas por lo que se catalogan como una sola). El anillo mimético *postman* fue muestreado en los departamentos de Valle del Cauca (corregimiento La Elsa), Guaviare (vereda Playa Güio) y Meta (municipio de San Martín) (Figura 2). Se recolectaron 2 especies diferentes en el anillo *postman* (*H. erato* y *H. melpomene*) y 4 subespecies (*H. e. venus*, *H. e. hydara*, *H. m. vulcanus* y *H. m. melpomene*) para un total de 36 individuos. Para el anillo *dennis-ray* se colectaron 4 especies (*H. erato*, *H. melpomene*, *H. elevatus* y *H. aede*) y 6 subespecies (*H. e. elevatus*, *H. e. reductumacula*, *H. e. lativitta*, *H. m. vicina*, *H. m. malleti* y *H. a. bartleti*) para un total de 28 individuos.

El tórax, el abdomen y el ala derecha de cada individuo se guardaron en viales plásticos con metanol al 100% y mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  para conservar los compuestos cianogénicos (CNgls). Finalmente, el ala izquierda fue guardada en sobres entomológicos como referencia morfológica de los individuos y para los posteriores análisis de coloración.



**Figura 2. Muestreo de las especies y subespecies del género *Heliconius* incluidos en este estudio.** Los círculos corresponden a las coordenadas geográficas de las localidades muestreadas para las especies perteneciente al anillo *dennis-ray* y los triángulos corresponden a las especies del anillo *postman*.

### Extracción y cuantificación CNglcs

Previo a la extracción, se calculó el peso seco neto del cuerpo y el ala de cada espécimen. La cuantificación de la toxicidad se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en De castro, (2017). Para esta se utilizó la técnica de “Liquid Chromatography- Mass Spectrometry (LC-MS/MS)” usando un “Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies, Germany)” unido a un espectrómetro de masas con trampas de iones Bruker HCT- Ultra (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), sobre los fragmentos de la mariposa previamente conservados en metanol (tórax y abdomen). La cantidad total de cada compuesto se estimó basándose en las áreas de los picos del cromatograma de iones extraídos (EIC) y se cuantificó según las curvas de calibración de

linamarina, lotaustralina y amigdalina (los dos primeros CNglcs alifáticos y el tercero aromático). La cuantificación de la concentración de CNglcs presentes en las muestras de mariposas se basó en una ecuación de regresión lineal calculada a partir de una curva estándar (Briolat et al., 2017; Cortesi & Cheney, 2010). Los espectros de masas se analizaron utilizando el software Bruker Compass – Data analysis 4.3 (x64). Por último, la concentración de cada glucósido cianogénico (CNglc) para cada individuo se reportó en  $\mu\text{g}$  de CNglc/mg de peso de mariposa seca.

### Cuantificación del color

La cuantificación de la coloración se hizo a partir de la obtención de medidas de reflectancia de 3 puntos diferentes de cada color en el ala izquierda sección anterior y vista dorsal/ventral usando un espectrómetro Ocean Optics USB2000. Posteriormente, se utilizó el paquete pavo del software R versión 4.1.2. para: *i*) verificar el patrón general de cada color graficando las curvas de reflectancia, *ii*) calcular la media de las tres medidas tomadas por cada color en cada área del ala y, *iii*) calcularlos contrastes cromáticos (color) y acromáticos (brillo) entre el fondo negro del ala y los diferentes colores de las bandas, así como también, entre los diferentes parches de colores y el fondo verde del bosque. Dichos contrastes fueron calculados a partir de dos modelos de visión aviar, *Cyanistes caeruleus* (sensible a la luz UV) (Hart et al., 2000) y *Pavo cristatus* (sensible a luz violeta) (Hart, 2002), esto dado que las aves y en concreto estas dos especies ya han sido previamente estudiadas e implementadas en evaluaciones de coloración en *Heliconius* y sus sistemas visuales se asemejan y comprenden el de la mayoría de las aves (Llaurens et al., 2014; Briolat et al., 2017). Adicionalmente, los contrastes se evaluaron bajo cuatro tipos de luz natural (fs= Bosque ws= Bosque en transición, sg= Claro pequeño y lg= Claro grande). La unidad de medida de estos análisis son los valores de diferencias apenas perceptibles ('just-noticeable differences' o JNDs) con un valor de umbral de 1, valores de contrastes superiores a 1 significan que las aves logran discriminar dichos colores.

### Análisis estadísticos

Para determinar si existe una señal honesta de la coloración en estas mariposas, se estimó la relación entre la toxicidad (variable dependiente), la coloración (evaluada por medio del

cálculo de contrastes) y la especie (variables explicativas) aplicando un modelo lineal múltiple (lm) para cada contraste (n=4 y n=2) respectivamente para los anillos *dennis-ray* y *postman*. De esta manera, evaluamos no solo el efecto de la coloración en la toxicidad, si no también si existen diferencias en la toxicidad entre las especies. Adicionalmente, se corrieron modelos incluyendo la interacción coloración (contraste)-especie para verificar si existe algún tipo de asociación de estas dos variables que explique la toxicidad. Se evaluaron los modelos con y sin interacción con base en el cálculo del Akaike Information Criterion (AIC) usando la función AIC () del paquete “lme4” (Bates et al., 2021) en el software R versión 4.1.2. Este análisis permitió escoger el mejor modelo que explique los datos. Adicionalmente, en el caso del anillo *postman* se incluyó la localidad como otra variable explicativa dado que una de las ubicaciones de muestreo (Valle del cauca) se encuentra a una distancia considerable de las otras 2 (Meta-Guaviare). Para aquellas variables explicativas que resultaron significativas en los lm, se realizó una ANOVA o una t-Student para determinar que especies y contrastes son diferentes en cada anillo.

## Resultados

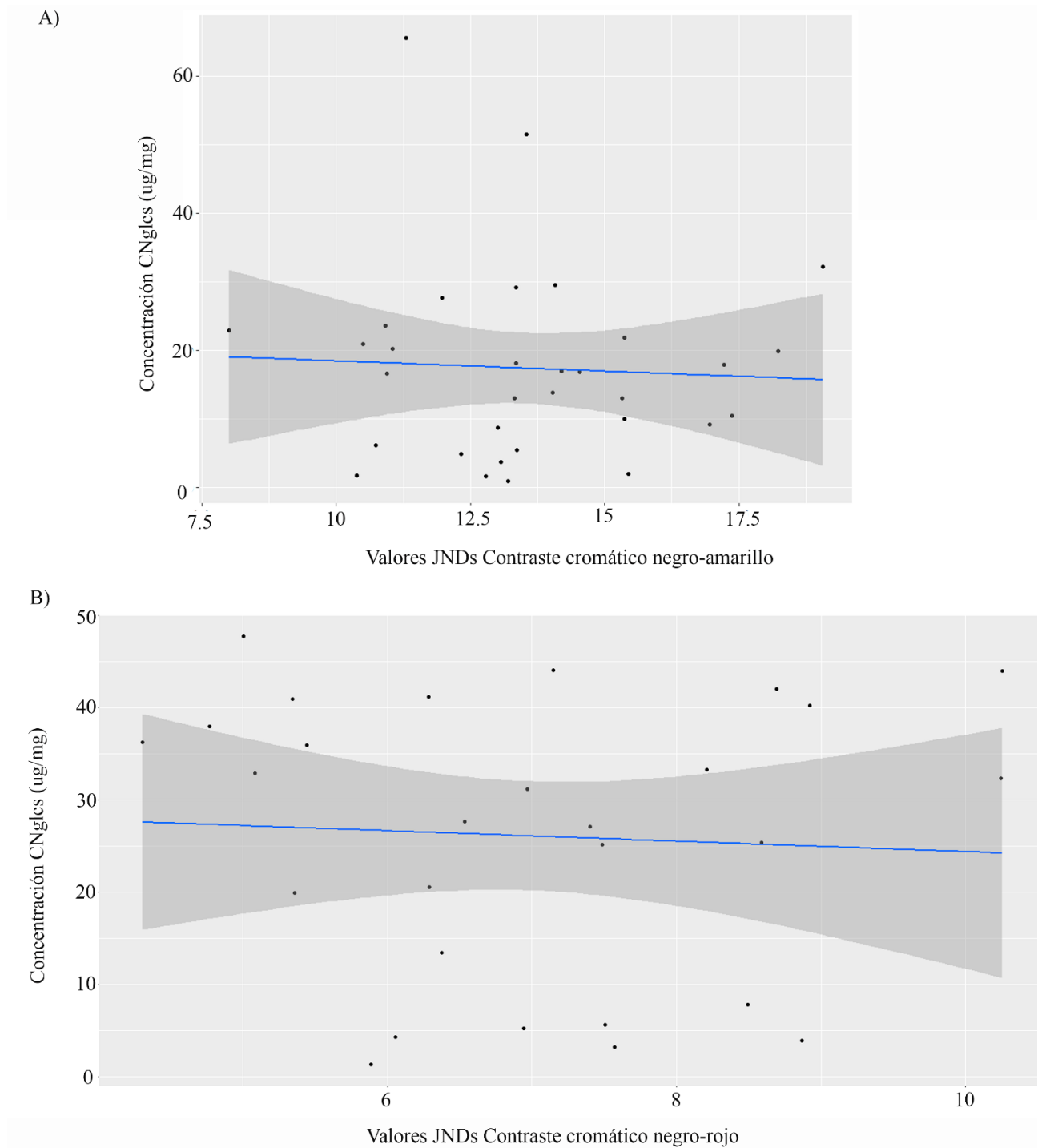
### Selección de modelos

Para los dos anillos miméticos se encontró que en la mayoría de los casos el mejor modelolineal (lm) que explica la relación entre la toxicidad, los contrastes de color, y las especies es aquel donde no se incluye la interacción entre las variables explicativas (Suplementario Tabla S1). Ninguno de los 28 modelos indico que haya una relación significativa entre la variable de la toxicidad total y la coloración, tanto en los contrastes cromáticos como acromáticos (Tabla 1). Adicionalmente, se graficó el comportamiento de la toxicidad en comparación con los distintos contrastes con el fin de visualizar la no relación entre caracteres (Figura 3 y suplementario Figura 31S-40S). Por su parte la variable especie si parece explicar las variaciones de toxicidad como se detallará más adelante.

**Tabla 1. Modelos lineales evaluados en este estudio entre toxicidad, coloración y especie.** La variable dependiente es la toxicidad y las variables explicativas evaluadas fueron coloración, especie para el anillo *dennis-ray*. Adicionando como variable explicativa la localidad para el anillo *postman*. La varianza explicada en todos los modelos esta entre el 50 y 70%. Los valores en negrilla

fueron significativos al 0.05.

Anillo mimético	Contraste	Variable dependiente	Variables explicativas	Pr(> t )
DENNIS-RAY	Cromático	Toxicidad	Negro-Amarillo	0.425
			Especie	<b>1.25E-05</b>
			Negro-Rojo	0.5318
			Especie	<b>1.42E-05</b>
			Amarillo-Fondo	0.9072
			Especie	<b>1.89E-05</b>
	Acromático	Toxicidad	Rojo-Fondo	0.05632
			Especie	<b>7.51E-06</b>
			Negro-Amarillo	0.233
			Especie	<b>9.89E-06</b>
			Negro-Rojo	0.5099
			Especie	<b>1.39E-05</b>
			Amarillo-Fondo	0.5884
			Especie	<b>4.42E-05</b>
POSTMAN	CROMÁTICO	Toxicidad	Rojo-Fondo	0.1694
			Especie	<b>6.70E-06</b>
			Negro-Rojo	0.861397
			Especie	<b>1.11E-02</b>
			Localidad	<b>7.47E-03</b>
	ACROMÁTICO	Toxicidad	Rojo-Fondo	0.120438
			Especie	<b>0.015054</b>
			Localidad	<b>3.01E-03</b>
			Negro-Rojo	0.7027
			Especie	<b>1.48E-02</b>
			Localidad	<b>1.48E-02</b>
			Rojo-Fondo	0.21913
			Especie	<b>1.29E-02</b>
			Localidad	<b>4.07E-03</b>

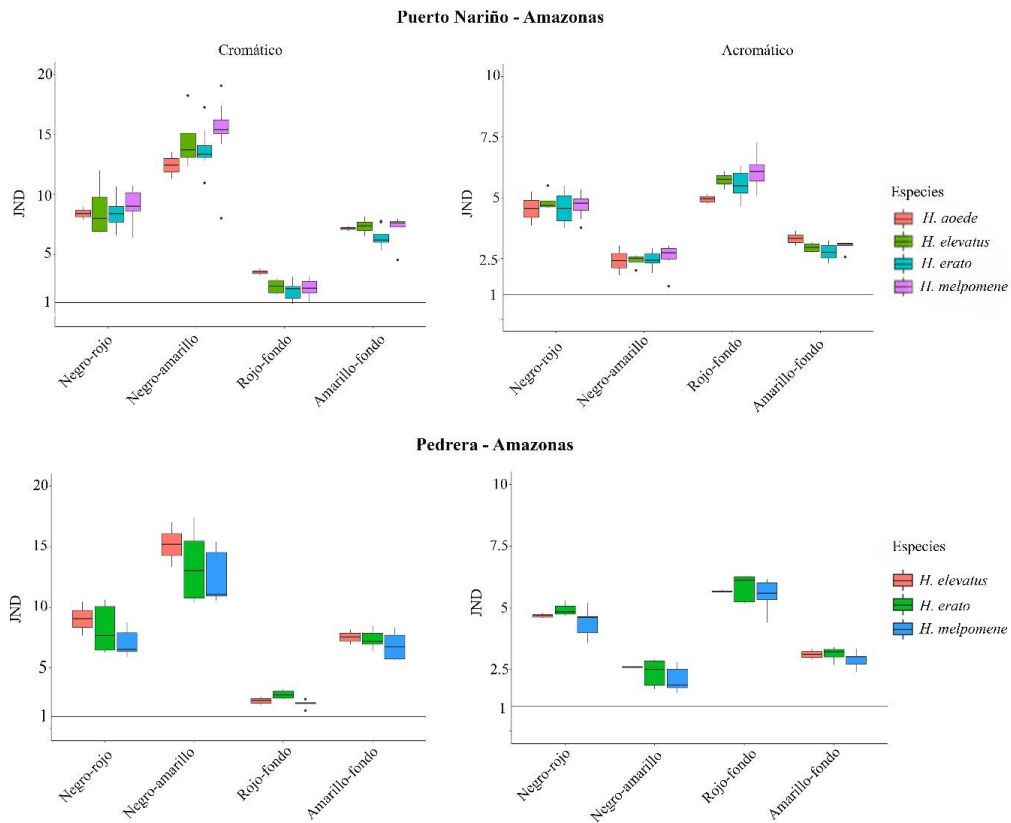


**Figura 3. Ejemplos de la no correlación entre coloración-toxicidad para los anillos *dennis-ray* y *postman*.** A) Eje X: Valores JNDs para contraste acromático evaluado bajo el tipo de visión aviar UVS, vista dorsal del ala y luz ambiental claro grande para el anillo *dennis-ray*. Eje Y: Concentración total de CNglcs por cada individuo perteneciente al anillo *dennis-ray* B) Eje X: Valores JNDs para contraste cromático evaluado bajo el tipo de visión aviar UVS, vista dorsal del

ala y luz ambiental claro grande para el anillo *postman*. Eje Y: Concentración total de CNgls por cada individuo perteneciente al anillo *postman*.

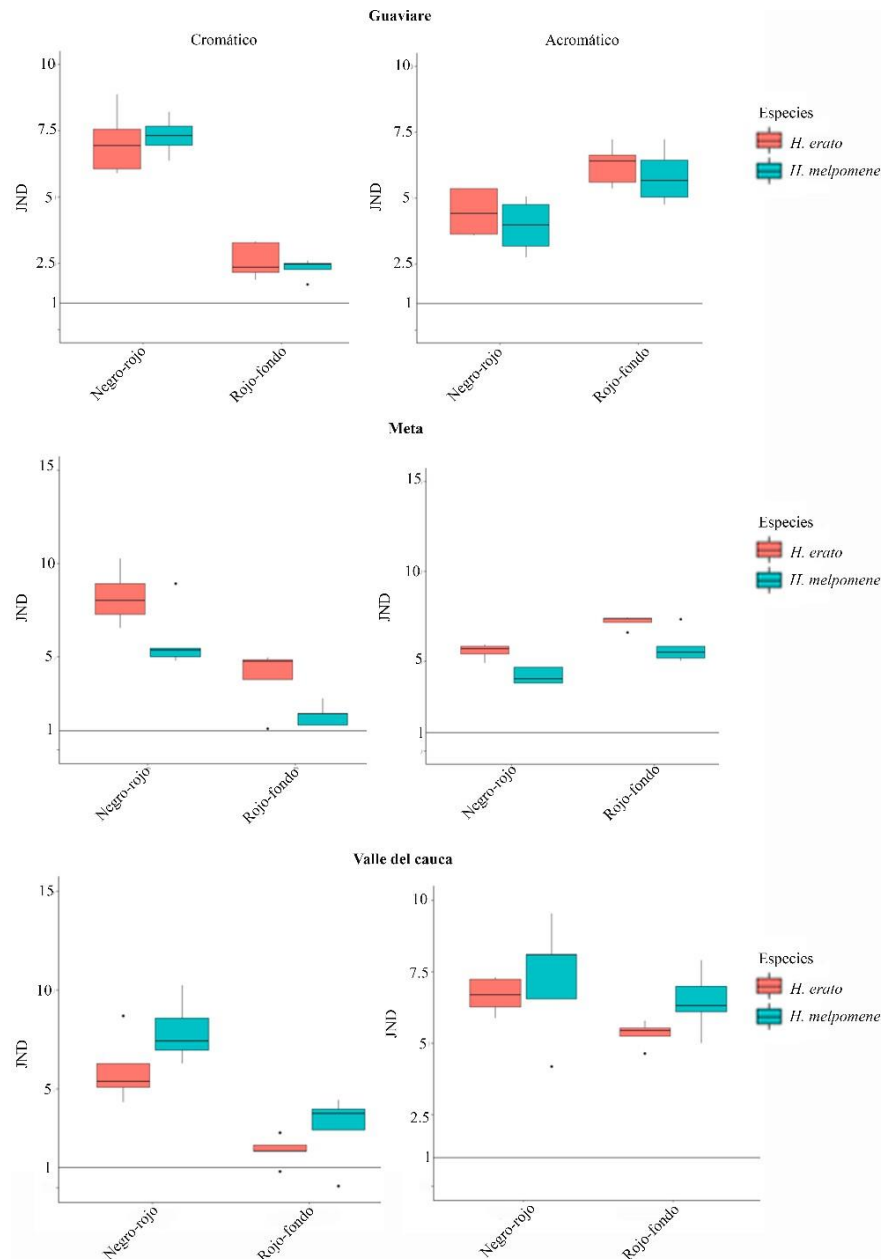
### Cuantificación del color

En los dos anillos miméticos, independientemente de la superficie alar evaluada y el modelo de visión implementado, los valores de JNDs fueron mayores a 1 en todas las especies, lo cual indica que las aves logran distinguir entre estos dos colores (Figura 4, 5 y suplementario Figura S1-S30), aunque esto no se cumple bajo todos los tipos de luz y de contrastes (cromáticos y acromáticos) (Figura S1, S4, S8, S12, S16, S19, S20, S27, S28). En general, los valores de los contrastes disminuyen a medida que la cantidad de luz ambiental se reduce en todas las especies afectando la capacidad discriminativa de las aves. En específico, en los contrastes cromáticos el ave no logra distinguir entre el rojo y el fondo del bosque (Suplementario Figura S1-S18 y S23-S26) y en los contrastes acromáticos no distingue el amarillo contra el negro (Suplementario Figura S1-S7 y S10-S15).



**Figura 4. JNDs entre los parches de color para cada especie para los diferentes contrastes. Contraste cromáticos y acromáticos entre las diferentes bandas de color contra el negro y el fondo**

del bosque para el anillo *dennis-ray* en las diferentes localidades. Evaluados bajo el tipo de visión aviar UVS, vista dorsal del ala y la luz ambiental claro grande.



**Figura 5. JNDs entre los parches de color para cada especie para los diferentes contrastes.** Contraste cromáticos y acromáticos entre las diferentes bandas de color contra el negro y el fondo del bosque para el anillo *postman* en las diferentes localidades. Evaluados bajo el tipo de visión aviar UVS, vista dorsal del ala y la luz ambiental claro grande.

En el anillo *dennis-ray* los parches de color amarillo contra el negro interno del ala

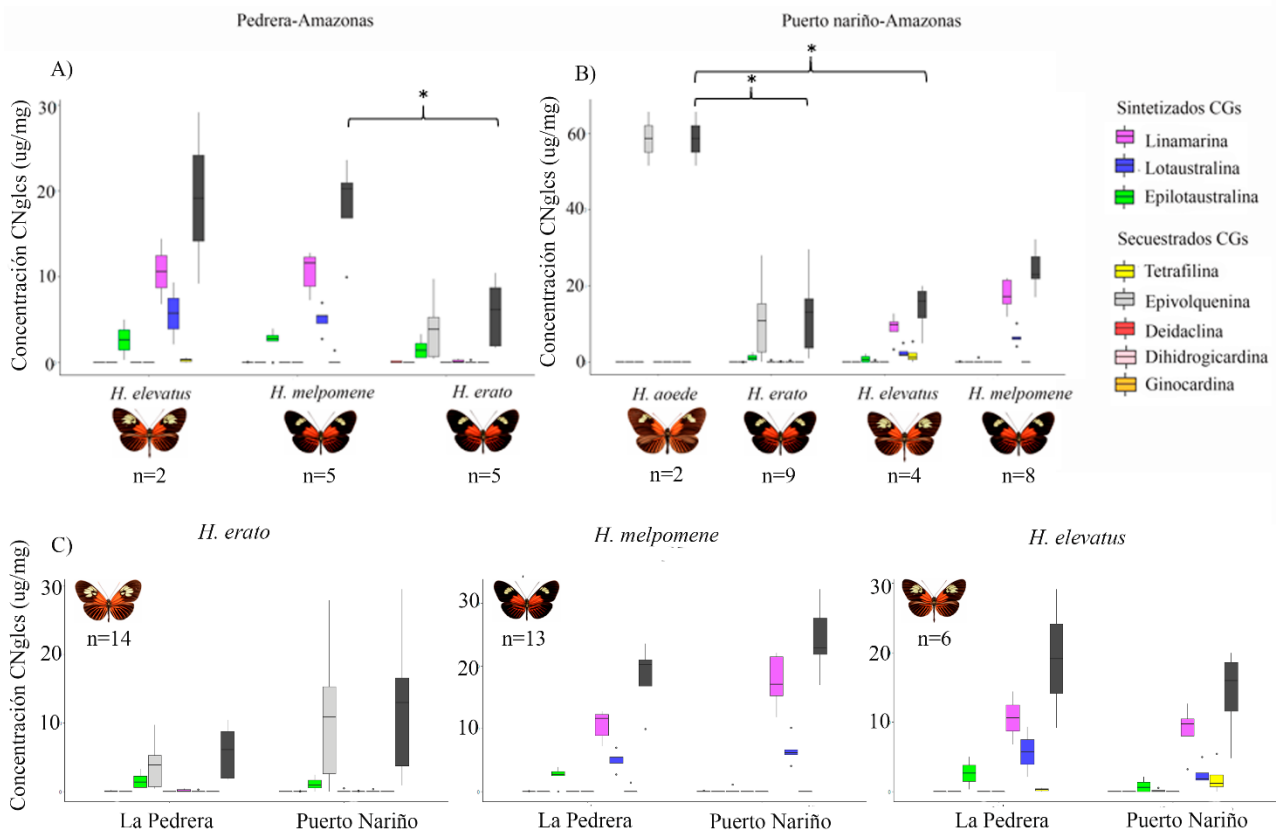
obtuvieron el mayor contraste cromático en todas las especies. Sin embargo, el patrón cambia en el contraste acromático ya que los parches de color rojo contra el fondo verde del bosque son los que obtienen el mayor valor (Figura 4 y suplementarios Figura S1-S3 y S8-S11). Este patrón es el mismo para las dos localidades en estudio y no encontramos diferencias entre los JNDs entre las especies (Figura 4 y suplementarios Figura S1-S15). En el anillo *postman* en todas las localidades se encontró que las bandas de color rojo contra el negro obtuvieron el mayor contraste cromático en las dos especies. Sin embargo, en las localidades de Guaviare y Meta el patrón cambia en el contraste acromático ya que el color rojo contra el fondo verde del bosque son los que obtienen el mayor valor de contraste. En la localidad del Valle del Cauca, el contraste entre el parche de color rojo contra negro del ala vuelve a ser ligeramente mayor que el contraste entre el rojo y el fondo del bosque (Figura 5).

### Cuantificación de CNglcs

En cuanto a la toxicidad, el modelo lm mencionado anteriormente mostro que la variable especie si tiene una relación significativa con la toxicidad en los dos anillos miméticos y entre las localidades en el anillo *postman* (Tabla 1). En el anillo *dennis-ray* de la localidad de la Pedrera-Amazonas encontramos que las especies *H. melpomene* y *H. elevatus* tienen mayor cantidad total de CNglcs que la especie *H. erato*, siendo esta diferencia solamente significativa entre las especies *H. melpomene* y *H. erato* (ANOVA-*p-value*= 0.021) (Figura 6A). Así mismo, el perfil cianogénico de la especie *H. erato* varia con respecto a las demás especies. Solamente en *H. erato* se encontró el compuesto epivolquenina, pero no se reportó lotaustralina, y linamarina se encuentra en una concentración muy baja (Figura 6).

Un patrón similar se encontró en la localidad de Puerto Nariño con respecto a *H. erato*. Aunque no se encuentran diferencias significativas de esta especie con respecto a *H. melpomene* y *H. elevatus*, esta presenta la menor concentración total de CNglcs (Figura 6B). Adicionalmente, en esta localidad se encontró que la especie *H. aoede* tiene la mayor cantidad total de CNglcs y presenta diferencias significativas con *H. elevatus* (*p-value*= 0.007) y *H. erato* (*p-value*= <.001). Sin embargo, de esta especie solo se analizaron dos individuos. Al igual que en la Pedrera, existen diferencias en los perfiles cianogénicos entre las especies. En *H. aoede* y *H. erato* se encontró el compuesto epivolquenina, pero no se reportaron lotaustralina y linamarina presente en las

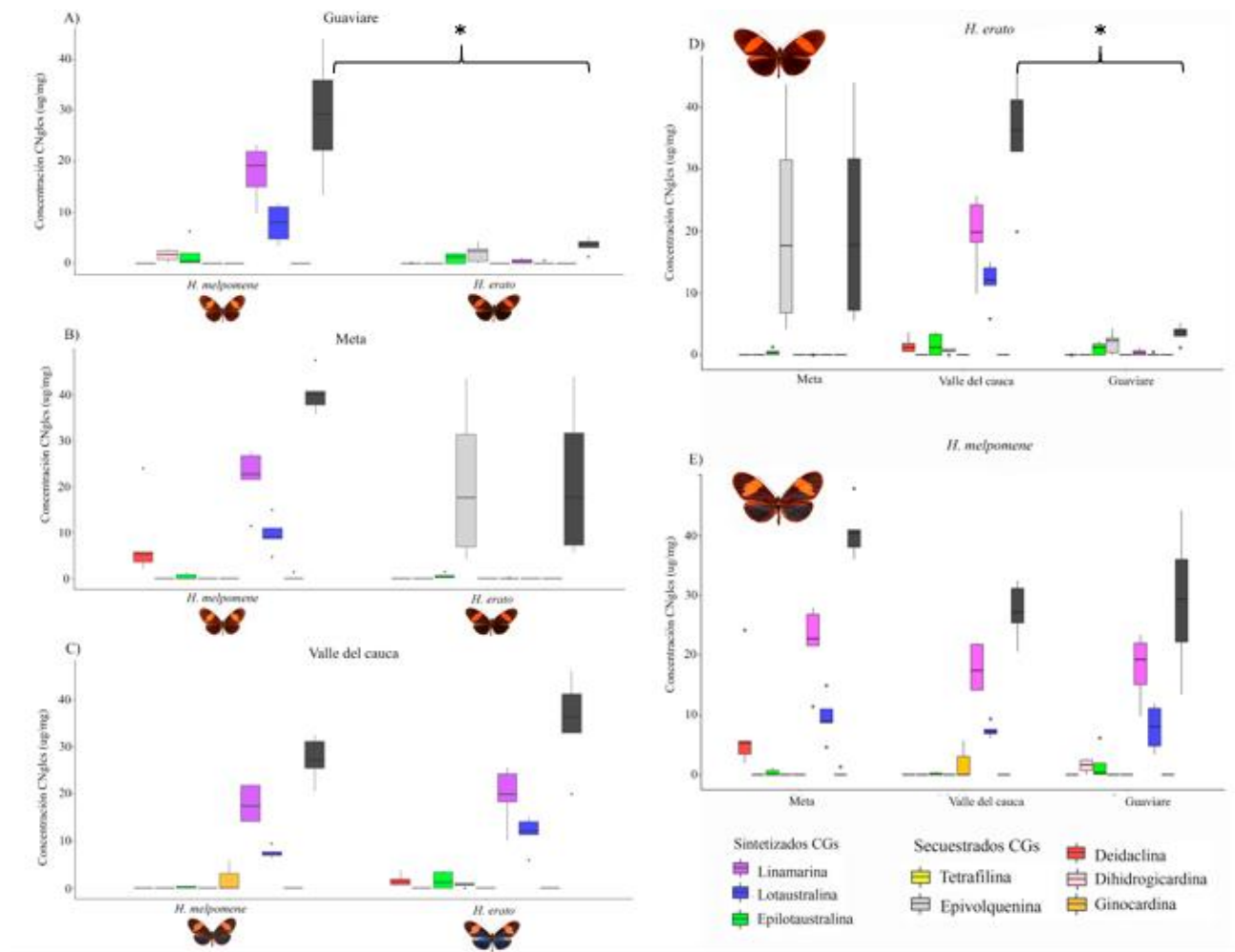
especies *H. melpomene* y *H. elevatus* (Figura 6B). No se observaron diferencias en la concentración total de CNglcs al evaluar una misma especie en ambas localidades (Figura 6C).



**Figura 6. Perfiles cianogénicos de las especies del anillo *dennis-ray* en las diferentes localidades.** A) la Pedrera - Amazonas y B) Puerto Nariño – Amazonas C) para cada especie entre las diferentes localidades. Los \* indican las especies que tienen diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en su composición total.

En el anillo *postman*, encontramos que la especie *H. melpomene* presenta mayor cantidad total de CNglcs que *H. erato* en las localidades de Guaviare y Meta, pero no en la localidad del Valle del Cauca (Figura 7A-C). Sin embargo, diferencias significativas entre las especies solo se encontraron en la localidad de Guaviare ( $p\text{-value} = 0.029$ ) (Figura 7C). En las localidades de Guaviare y Meta se encontraron diferencias en los perfiles cianogénicos entre las especies (Figura 7A-C). Como se reportó en el anillo *dennis-ray*, en la especie *H. erato* predomina la presencia de epivolquenina. Aunque en la localidad de Guaviare el compuesto de linamarina y epivolquenina son encontrados en cantidades pequeñas (Figura 7A-C). Interesantemente, el perfil cianogénico de la especie *H. erato* en la localidad del Valle del Cauca varía considerablemente con respecto a las

demás localidades. Solamente en esta localidad se reporta la presencia de linamarina, epivolquenina y deidaclina en *H. erato* (Figura 7C). En esta misma localidad encontramos que la especie *H. melpomene* tiene el compuesto ginocardina, el cual no se encontró en las otras localidades (Figura 7C).



**Figura 7. Perfiles cianogénicos de las especies del anillo *postman* en las diferentes localidades.**

A) Guaviare, B) Meta, C) Valle del cauca, D) por especies en diferentes localidades. Los \* indican las especies y/o localidades que tienen diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en su composición total.

## Discusión

Los resultados muestran que la coloración aposemática de las especies pertenecientes a los

anillos miméticos *dennis-ray* y *postman* del género *Heliconius* no son una señal honesta de su toxicidad. Es decir, que especies más tóxicas no son necesariamente más visibles o contrastantes para las aves. Esta carencia de correlación ha sido previamente encontrada en otros taxa. Por ejemplo, en las aves paseriformes de la familia Pachycephalidae (Dumbacher et al., 2000; Dumbacher et al., 2008), en salamandras (Mochida et al., 2013), en las ranas de la familia Dendrobatidae (Wang 2011) y el género de polillas *Zygaena* (Briolat et al., 2018)

Algunos estudios han sugerido que la variación en la coloración y/o la toxicidad de las especies podría estar más relacionada con la interacción de otros factores, tales como, la disponibilidad de nutrientes y la selección sexual (Kikuchi et al., 2021; Klein & De Araújo, 2013). El modelo conocido como la “limitación de recursos de la honestidad de las señales del aposematismo” predice que si los recursos son abundantes las presas deberían invertir principalmente en obtener los compuestos tóxicos o los precursores para la síntesis, más que en producir señales visuales, mientras que si los recursos son limitados las señales de coloración deberían ser más honestas (Blount et al., 2008). Esto se encontró en las ranas de la familia Dendrobatidae, donde especies con mayor toxicidad y menor conspicuidad visual se encontraban en zonas en las que las ranas disponían de alcaloides más potentes para su dieta, reflejando un compromiso estratégico entre señales y defensas en el aposematismo (Darst et al. 2006; Speed & Ruxton, 2007).

Este modelo basado en la disponibilidad de recursos podría explicar la interesante variación en el total de CNgls, en los perfiles de toxicidad y en los contrastes de coloración que se encontraron en la especie *H. erato* (Figura 5 y 7). Esta especie en la localidad del Valle del Cauca es más tóxica y presenta compuestos cianogénicos como lotaustralina y linamarina (sintetizados de novo) que no se encontraron en otra localidad, a su vez que presenta menor contraste cromático en la misma localidad (Figura 5 y 7C). Se hipotetiza que, en el Valle de Cauca, esta especie tiene a disposición los nutrientes necesarios para la síntesis de estos compuestos químicos lo cual no parece que esté ocurriendo en las otras localidades donde es menos tóxica y el contraste de color es mayor (Figura 5 y 7A-B).

También se hipotetizado que un punto clave para la existencia de la honestidad de señal es la existencia de un vínculo fisiológico entre ambos caracteres (Blount et al., 2008; Lee et al., 2011). Si no existe relación entre ambos caracteres, estos pueden desacoplarse y evolucionar de forma independiente, al estar influenciados también por fuerzas selectivas diferentes como la selección

sexual en el caso de la coloración (Lee et al., 2011; Darst et al., 2006; Lewis & Cratsley, 2008). En *Heliconius* se ha detectado como la necesidad de reconocimiento y cortejo entre conespecíficos ha conllevado a la creación y variación de canales de coloración que pueden generar divergencias en los patrones de señalización que no tengan un efecto directo en el aprendizaje del depredador. El efecto de la selección sexual puede generar cambios de coloración incluso entre individuos de una misma especie sin afectar la toxicidad (Briolat et al., 2018; Llaurens et al., 2014 Dell'Aglio et al., 2019).

Por otra parte, se ha hipotetizado que la ausencia de la relación entre la coloración y la toxicidad puede deberse a una estrategia evolutiva distinta del mimetismo Müllleriano según el modelo estricto de Müller (Balogh et al., 2008; Speed & Turner, 1999, Müller, 1878). Es decir, que una experiencia variable para el depredador al encontrar distintos grados de toxicidad bajo un patrón de coloración uniforme puede llegar a tener un efecto más marcado en la generación de asociaciones entre señales visuales de advertencia y degustaciones desagradables (Pearce & Hall, 1980; Bergvall & Leimar, 2005; Ihalainen et al., 2006). De esta manera, la variabilidad en la defensa no diluye la eficacia de la señal aposemática, si no que puede generar un refuerzo al considerar dicha sorpresa de asociabilidad (Ihalainen et al., 2006). Esto puede relacionarse con las diferencias significativas de toxicidad encontradas entre algunos pares de especies de un mismo anillo (Figura 6 y 7), en donde observamos una variabilidad de la toxicidad en ambos anillos, especialmente en *dennis-ray*, pero una señal de advertencia uniforme o estable (Figura 4 y 6).

Asimismo, algunos autores han mencionado que el factor cualitativo de la relación toxicidad-coloración puede ser igual de importante que el factor cuantitativo dentro del aposematismo y mimetismo (Rowe & Skelhorn, 2005). De esta manera, no sería necesaria la dependencia cuantitativa entre la coloración y la toxicidad, pudiendo esta última variar no solo en concentración si no también en composición dentro de un mismo anillo mimético. Se ha reportado como presas con diferencias cualitativas en toxicidad (diferentes compuestos tóxicos) generar una mayor asociación o velocidad de aprendizaje en los depredadores (Skelhorn & Rowe, 2005). La literatura sugiere que exclusividad en la composición tóxica de cada especie mimética en lugar de que las especies compartan el mismo mix de toxinas puede generar un mayor refuerzo de aprendizaje. Esta mejora en la enseñanza puede deberse a una mayor sorpresa por parte del depredador al tener experiencias desagradables variables, de forma que resulta más complejo estimar el posible efecto nocivo de una especie aposemática, al no conocer que toxina esta posee

y en qué cantidad (Skelhorn & Rowe, 2005; Ihalainen et al., 2006; Courville et al., 2006).

No obstante, aun cuando se ha evaluado la importancia adaptativa que también implica la variación en términos cualitativos de la toxicidad, no se ha estudiado el efecto conjunto del espectro de variaciones cuantitativas y cualitativas de CNglcs, en la estabilidad del mimetismo. Dado que, por ejemplo, con relación a la toxicidad y sabor se ha encontrado como una toxina moderada pero suficientemente desagradable puede aumentar las tasas de rechazo por parte del depredador (Holen, 2013), aunque estas correlaciones no siempre son claras (Winters et al., 2018).

En conclusión, en estos dos anillos evaluados dentro del género *Heliconius* no se encontró evidencia de una señal honesta de la toxicidad. Parece que la limitación del recurso, como, por ejemplo, la presencia diferencial de plantas huésped podría estar contribuyendo a generar un espectro de toxicidad independiente de la coloración. Por lo tanto, el modelo de limitación del recurso parece ser una estrategia evolutiva más plausible para explicar el mantenimiento del mimetismo. Sin embargo, más estudios acerca del comportamiento de la distribución de recursos entre toxicidad y coloración serán necesarios para establecer si verdaderamente existe una relación entre ambos caracteres y dado el caso, que tipo de comportamiento expresaría (señalización honesta).

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad del Rosario y en concreto al semillero de genética de la Facultad de Ciencias Naturales por sus valiosos comentarios; un agradecimiento especial al director de proyecto Camilo Salazar y mi codirectora Nicol Rueda, así como a mi colega de profesión Alexandra Arias.

## **Referencias**

Arias, M., Meichanetzoglou, A., Elias, M., Rosser, N., de-Silva, D., Nay, B., & Llaurens, V. (2016). Variation in cyanogenic compounds concentration within a *Heliconius* butterfly community: does mimicry explain everything? *BMC Evolutionary Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0843-5>

Balogh, A., Gamberale-Stille, G., & Leimar, O. (2008). Learning and the mimicry spectrum: from quasi-Bates to super-Müller. *Animal Behaviour*, 76(5), 1591-1599. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.07.017>

Bates, Douglas, Martin Maechler, Ben Bolker, and Steven Walker. (2021). *Lme4: Linear Mixed-Effects Models Using Eigen and S4*. <https://github.com/lme4/lme4/>.

Bergvall, U., & Leimar, O. (2005). Plant secondary compounds and the frequency of foodtypes affect food choice by mammalian herbivores. *Ecology*, 86(9), 2450-2460. <https://doi.org/10.1890/04-0978>

Blount, J., Speed, M., Ruxton, G., & Stephens, P. (2008). Warning displays may function as honest signals of toxicity. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1658), 871-877. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1407>

Blount, J., Rowland, H., Mitchell, C., Speed, M., Ruxton, G., Endler, J., & Brower, L. (2021). The price of defence: toxins, visual signals and oxidative state in an aposematic butterfly. <https://doi.org/10.1101/2021.12.08.471400>

Briolat, E., Burdfield-Steel, E., Paul, S., Rönkä, K., Seymoure, B., Stankowich, T., & Stuckert, A. (2018). Diversity in warning coloration: selective paradox or the norm?. *Biological Reviews*, 94(2), 388-414. <https://doi.org/10.1111/brv.12460>

Briolat, E., Zagrobelny, M., Olsen, C., Blount, J., & Stevens, M. (2018). Sex differences but no evidence of quantitative honesty in the warning signals of six-spot burnet moths (*Zygaena filipendulae* L.) \*. *Evolution*, 72(7), 1460-1474. <https://doi.org/10.1111/evo.13505>

Cortesi, F., & Cheney, K. (2010). Conspicuousness is correlated with toxicity in marine opisthobranchs. *Journal Of Evolutionary Biology*, 23(7), 1509-1518. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02018.x>

Courville, A., Daw, N., & Touretzky, D. (2006). Bayesian theories of conditioning in a

changing world. *Trends In Cognitive Sciences*, 10(7), 294-300.  
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.05.004>

Darst, C., Cummings, M., & Cannatella, D. (2006). A mechanism for diversity in warning signals: Conspicuousness versus toxicity in poison frogs. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 103(15), 5852-5857. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600625103>

Dell'Aglio, D., Troscianko, J., Stevens, M., McMillan, W., & Jiggins, C. (2019). The conspicuousness of the toxic Heliconius butterflies across time and habitat. <https://doi.org/10.1101/662155>

Dell'Aglio, D. D., Troscianko, J., McMillan, W. O., Stevens, M., & Jiggins, C. D. (2018). The appearance of mimetic Heliconius butterflies to predators and conspecifics. *Evolution; international journal of organic evolution*, 72(10), 2156–2166. <https://doi.org/10.1111/evo.13583>

Dumbacher, J., Spande, T., & Daly, J. (2000). Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: A second toxic bird genus ( *Ifrita kowaldi* ) from New Guinea. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 97(24), 12970-12975. <https://doi.org/10.1073/pnas.200346897>

Dumbacher, J., Deiner, K., Thompson, L., & Fleischer, R. (2008). Phylogeny of the avian genus Pitohui and the evolution of toxicity in birds. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 49(3), 774-781. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.09.018>

Finkbeiner, S., Briscoe, A., & Reed, R. (2014). Warning signals are seductive: Relative contributions of color and pattern to predator avoidance and mate attraction in Heliconius butterflies. *Evolution*, 68(12), 3410-3420. <https://doi.org/10.1111/evo.12524>

Hart, N. (2002). Vision in the peafowl (Aves:Pavo cristatus). *Journal Of Experimental Biology*, 205(24), 3925-3935. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.24.3925>

Hart, N. S., Partridge, J. C., Cuthill, I. C., & Bennett, A. T. (2000). Visual pigments, oil

droplets, ocular media and cone photoreceptor distribution in two species of passerine bird: the blue tit (*Parus caeruleus* L.) and the blackbird (*Turdus merula* L.). *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, 186(4), 375–387. <https://doi.org/10.1007/s003590050437>

Holen, Ø. (2013). Disentangling taste and toxicity in aposematic prey. *Proceedings OfThe Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1753), 20122588. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2588>

Ihalainen, E., Lindström, L., & Mappes, J. (2006). Investigating Müllerian mimicry: predator learning and variation in prey defences. *Journal Of Evolutionary Biology*, 20(2), 780-791. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01234.x>

Jiggins, C. D. (2017). *The ecology and evolution of Heliconius butterflies*. Oxford University Press.

Kikuchi, D., Herberstein, M., Barfield, M., Holt, R., & Mappes, J. (2021). Why aren't warning signals everywhere? On the prevalence of aposematism and mimicry in communities. *Biological Reviews*, 96(6), 2446-2460. <https://doi.org/10.1111/brv.12760>

Klein, A., & de Araújo, A. (2013). Sexual Size Dimorphism in the Color Pattern Elements of Two Mimetic *Heliconius* Butterflies. *Neotropical Entomology*, 42(6), 600-606. <https://doi.org/10.1007/s13744-013-0157-x>

Kronforst, M., & Papa, R. (2015). The Functional Basis of Wing Patterning in *Heliconius* Butterflies: The Molecules Behind Mimicry. *Genetics*, 200(1), 1-19. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.172387>

Lee, T., Speed, M., & Stephens, P. (2011). Honest Signaling and the Uses of Prey Coloration. *The American Naturalist*, 178(1), E1-E9. <https://doi.org/10.1086/660197>

Lewis, S., & Cratsley, C. (2008). Flash Signal Evolution, Mate Choice, and Predation in Fireflies. *Annual Review Of Entomology*, 53(1), 293-321. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093346>

Lindström, L., Lyytinen, A., Mappes, J., & Ojala, K. (2006). Relative importance of taste and visual appearance for predator education in Müllerian mimicry. *Animal Behaviour*, 72(2), 323-333

Llaurens, V., Joron, M., & Théry, M. (2014). Cryptic differences in colour among Müllerian mimics: how can the visual capacities of predators and prey shape the evolution of wing colours?. *Journal Of Evolutionary Biology*, 27(3), 531-540. <https://doi.org/10.1111/jeb.12317>

Maan, M., & Cummings, M. (2012). Poison Frog Colors Are Honest Signals of Toxicity, Particularly for Bird Predators. *The American Naturalist*, 179(1), E1-E14. <https://doi.org/10.1086/663197>

Mattila, A., Jiggins, C., Opedal, Ø., Montejo-Kovacevich, G., Pinheiro de castro, É., & McMillan, W. et al. (2021). Evolutionary and ecological processes influencing chemical defense variation in an aposematic and mimetic Heliconius butterfly. *Peerj*, 9, e11523. <https://doi.org/10.7717/peerj.11523>

Medina, I., Wallenius, T., & Head, M. (2019). No honesty in warning signals across life stages in an aposematic bug. *Evolutionary Ecology*, 34(1), 59-72. <https://doi.org/10.1007/s10682-019-10025-0>

Mochida, K., Kitada, M., Ikeda, K., Toda, M., Takatani, T., & Arakawa, O. (2013). Spatial and Temporal Instability of Local Biotic Community Mediate a Form of Aposematic Defense in Newts, Consisting of Carotenoid-Based Coloration and Tetrodotoxin. *Journal Of Chemical Ecology*, 39(9), 1186-1192. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0342-8>

Müller, F. (1878). *Über die vorteile der mimicry bei schmetterlingen.*

Pearce, J. M., & Hall, G. (1980). A model for Pavlovian learning: Variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychological Review*, 87(6), 532–552. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.87.6.532>

Pinheiro de Castro, É., Zagrobelny, M., Zurano, J., Zikan Cardoso, M., Feyereisen, R., & Bak, S. (2019). Sequestration and biosynthesis of cyanogenic glucosides in passion vine butterflies and consequences for the diversification of their host plants. *Ecology And Evolution*, 9(9), 5079-5093. <https://doi.org/10.1002/ece3.5062>

Preißler, K., Gippner, S., Lüddecke, T., Krause, E., Schulz, S., Vences, M., & Steinfartz, S. (2019). More yellow more toxic? Sex rather than alkaloid content is correlated with yellow coloration in the fire salamander. *Journal of Zoology*, 308(4), 293-300. <https://doi.org/10.1111/jzo.12676>

Rowe, C., & Skelhorn, J. (2005). Colour biases are a question of taste. *Animal Behaviour*, 69(3), 587-594. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.06.010>

Santos, J., Coloma, L., & Cannatella, D. (2003). Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 100(22), 12792-12797

Sculfort, O., Castro, E., Kozak, K., Bak, S., Elias, M., Nay, B., & Llaurens, V. (2020). Variation of chemical compounds in wild Heliconiini reveals ecological factors involved in the evolution of chemical defenses in mimetic butterflies. *Ecology and Evolution*, 10(5), 2677-2694. <https://doi.org/10.1002/ece3.6044>

Skelhorn, J. y Rowe, C. (2005). Saboreando la diferencia: ¿interactúan múltiples químicos de defensa en el mimetismo mülleriano?. *Actas. Ciencias biológicas*, 272 (1560), 339–345. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2953>

Speed, M., & Ruxton, G. (2007). How bright and how nasty: Explaining diversity in warning signal strength. *Evolution*, 61(3), 623-635. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00054.x>

Speed, M., & Turner, J. (1999). Learning and memory in mimicry: II. Do we understand the mimicry spectrum? *Biological Journal Of The Linnean Society*, 67(3), 281-312. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01935.x>

Stuckert, A., Saporito, R., & Summers, K. (2018). An Empirical Test Indicates Only Qualitatively Honest Aposematic Signaling Within a Population of Vertebrates. *Journal of Herpetology*, 52(2), 201-208. <https://doi.org/10.1670/17-047>

Summers, K., Speed, M., Blount, J., & Stuckert, A. (2015). Are aposematic signals honest? A review. *Journal Of Evolutionary Biology*, 28(9), 1583-1599. <https://doi.org/10.1111/jeb.12676>

White, T., & Umbers, K. (2021). Meta-analytic evidence for quantitative honesty in aposematic signals. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1949). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.0679>

Wilts, B., Vey, A., Briscoe, A., & Stavenga, D. (2017). Longwing (Heliconius) butterflies combine a restricted set of pigmentary and structural coloration mechanisms. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1073-1>

Winters, A., Wilson, N., van den Berg, C., How, M., Endler, J., & Marshall, N. et al. (2018). Toxicity and taste: unequal chemical defences in a mimicry ring. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1880), 20180457. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0457>