

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

Ensaio comportamental para inferir a fonte da informação do reconhecimento de parentesco em imaturos de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae)

Aluna: Bruna Oliveira Missaggia

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Co-orientadora: Janaína De Nardin

Trabalho de conclusão
apresentado como requisito
parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências
Biológicas.

Porto Alegre, julho de 2014.

Redigido segundo as normas do periódico *Ethology Ecology & Evolution*.

1 *Ethology Ecology & Evolution*

2 **Ensaio comportamental para inferir a fonte da informação do**
3 **reconhecimento de parentesco em imaturos de *Heliconius erato phyllis***
4 **(Lepidoptera; Nymphalidae)**

5

6 B. O. MISSAGGIA ¹, J. DE NARDIN ^{1,2} e A.M. ARAÚJO ^{1,2}

7

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

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

13 -----

14 Correspondência Aldo Mellender de Araújo: Departamento de Genética,
15 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500,
16 Prédio 43323, sala 207. CEP: 91501-970. Cx. Postal 15053, Porto Alegre, RS,
17 Brasil. E-mail: aldo1806@gmail.com

18

19 Título curto: Protocolo para inferir reconhecimento de parentesco em larvas de
20 Lepidoptera

21

22 Este trabalho é parte do artigo 'An experimental approach to test the source of
23 information on kinship in butterfly immatures', recentemente aceito para
24 publicação no periódico *Ethology, Ecology, and Evolution* (anexo).

RESUMO

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

Lagartas recém-eclodidas de *Heliconius erato phyllis* reconhecem ovos irmãos, canibalizando preferencialmente os não-parentes. O objetivo deste trabalho foi verificar onde está a informação para reconhecimento do ovo, se no córion (origem materna) e/ou no embrião. Para isso foram elaborados protocolos de análise de comportamento com objetivo de averiguar se há reconhecimento de parentesco entre lagartas. A partir de observações chegou-se a cinco categorias comportamentais: indiferença, fuga, hostilidade, ataque e canibalismo. Fizeram-se testes de observação dos comportamentos de duplas de lagartas irmãs ou não-parentes para saber se haveria comportamento diferencial que indicasse reconhecimento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre lagartas irmãs e não-parentes para as categorias comportamentais analisadas. Apesar de haver reconhecimento de parentesco lagarta-ovo, não parece ocorrer reconhecimento lagarta-lagarta em *Heliconius erato phyllis*. Esses resultados sugerem que o sinal utilizado para o reconhecimento de parentesco está no córion do ovo e não na lagarta.

PALAVRAS-CHAVE: comportamento, canibalismo, reconhecimento de parentesco, sinal para reconhecimento, *Heliconius*, Lepidoptera.

INTRODUÇÃO

46

47

48 As relações de altruísmo foram um enigma no marco da evolução por
49 seleção natural, afinal como seriam selecionados comportamentos que
50 favorecem a sobrevivência e a reprodução de outros indivíduos em detrimento
51 da própria sobrevivência e reprodução?

52 Para explicar tal fenômeno, muito evidente, por exemplo, em castas
53 inférteis de insetos eussociais, W. D. Hamilton, em 1964, postulou a teoria da
54 seleção de parentesco. A seleção de parentesco explica a evolução de
55 características que favorecem a sobrevivência de parentes próximos do
56 indivíduo altruísta através de uma simples regra matemática: um alelo para o
57 altruísmo pode aumentar em frequência na população se a seguinte
58 desigualdade for satisfeita: $rb > c$. Onde r é o coeficiente de parentesco entre o
59 altruísta e o indivíduo que recebe ajuda; c o custo do ato (perda na produção
60 de prole futura em decorrência do comportamento altruísta); e b o benefício do
61 ato (prole extra que o indivíduo que recebe ajuda ganha). Portanto, a soma da
62 prole do indivíduo altruísta e a do parente que ele ajuda constitui a medida de
63 aptidão inclusiva (*inclusive fitness*).

64 Para que essa regra seja satisfeita e o nepotismo ocorra, aumentando a
65 frequência de alelos altruístas em uma população, é fundamental que haja
66 reconhecimento de parentesco.

67 O reconhecimento de parentesco, a capacidade de distinguir parentes
68 de não-parentes usando similaridade genética ou qualquer marca que seja
69 correlacionada com o parentesco (HOLMES 2004), tem sido evidenciado em
70 várias espécies de animais, tanto em vertebrados (SHARP et al. 2005; KRUCZEK

71 2007; MOORE 2007; SHERBORNE et al. 2007; GREEN et al. 2008; MEHLIS et al.
72 2010) como em invertebrados (LIZÉ et al. 2006; PATTERSON et al. 2008;
73 SCHNEIDER & BILDE 2008; DE NARDIN & ARAÚJO 2011), em plantas (DUDLEY &
74 FILE 2007) e também em protozoários (MEHDIABADI et al. 2006, 2008;
75 OSTROWSKI et al. 2008).

76 Além de casos de comportamento altruísta, acredita-se que a
77 capacidade de reconhecer parentes possa conferir maior aptidão (*fitness*)
78 devido a comportamentos como cuidado parental (BUKACIŃSKI et al. 2000) e
79 escolha de parceiro para evitar endocruzamento (GERLACH et al 2006).

80 O processo de reconhecimento de parentesco envolve três
81 componentes: a expressão de marcas fenotípicas únicas (*cues, labels*), a
82 percepção dessas marcas e o grau de correspondência com o “modelo de
83 reconhecimento” (*recognition template*) e a ação tomada pelo avaliador como
84 função da similaridade percebida entre o modelo e o fenótipo encontrado
85 (MATEO 2004 e referências lá indicadas).

86 Tendo em vista as importantes implicações evolutivas do
87 reconhecimento de parentesco, é fundamental que se estabeleçam critérios
88 seguros e objetivos para avaliar se há reconhecimento em uma determinada
89 espécie, a que fatores se deve o reconhecimento (genéticos, ambientais ou
90 ambos), se o reconhecimento persiste ao longo da vida dos organismos e onde
91 estão as marcas utilizadas para que se distingam parentes de não-parentes.

92 Para determinar se há reconhecimento de parentesco em insetos,
93 utilizam-se testes comportamentais analisando se existe diferença no
94 comportamento de agressividade entre parentes e não-parentes. Esses testes
95 se baseiam na premissa da assimetria de agressividade entre parentes e não-

96 parentes observada não apenas em insetos, mas em muitos outros táxons
97 como mamíferos (HOLMES et al. 1982), anfíbios (HOKIT, et al. 1996), peixes
98 (GRIFFITHS et al. 2000), répteis (LENA et al. 1998) e aves (PRAVOSUDOVA et al.
99 2001). Também há evidências de respostas diferenciadas a parentes e não-
100 parentes no ciclo de vida de invertebrados marinhos como mostra o trabalho de
101 WALDMAN (1988), no qual também se podem encontrar outros exemplos de
102 assimetria de agressividade entre parentes e não-parentes em todos os táxons
103 supracitados.

104 Do ponto de vista sensorial, as marcas usadas para discriminar parentes
105 de não parentes podem ser visuais, auditivas ou olfatórias. A produção de uma
106 marca que indica a identidade do remetente (*sender*) é uma questão
107 importante, porque ela pode mediar o reconhecimento de parentesco e então
108 ter um impacto significativo na aptidão do remetente o beneficiando com atos
109 altruístas (LIZÉ et al. 2010).

110 O reconhecimento de parentes em insetos sociais comumente conta
111 com quimiorrecepção associada a hidrocarbonetos epicuticulares (LIZÉ et al.
112 2010). Hidrocarbonetos cuticulares têm diversas funções em insetos e servem
113 como marcas químicas em processos de reconhecimento durante interações
114 interindividuais (DRONNET et al 2006). Acredita-se que as diferenças na
115 composição de hidrocarbonetos que possibilitam o reconhecimento de
116 parentesco em insetos sociais se devam a fatores genéticos e ambientais
117 (DRONNET et al 2006). Entretanto, para insetos solitários pouco é conhecido
118 sobre o tipo de marca utilizada no reconhecimento LIZÉ et al. 2010).

119 As lagartas recém-eclodidas da borboleta *Heliconius erato phyllis* reconhecem
120 irmãos biológicos, canibalizando preferencialmente os ovos não-parentes

121 quando há escolha. Quando apenas ovos irmãos estão disponíveis, a
122 frequência de canibalismo é significativamente inferior à frequência de
123 canibalismo de quando apenas ovos não-parentes estão disponíveis (DE
124 NARDIN & ARAÚJO 2011). O canibalismo não serve apenas para eliminar
125 competidores, mas também para prover nutrição nessa importante fase do
126 desenvolvimento. Estudos realizados por DE NARDIN (2012) sugerem que o
127 canibalismo sofre forte influência ambiental e o reconhecimento de parentesco
128 é determinado sobretudo por componentes genéticos. Além disso, é provável
129 que o canibalismo se deva à ausência ou a um baixo número de genes de
130 reconhecimento. O mesmo trabalho mostra que o reconhecimento de
131 parentesco observado nessa espécie evoluiu por seleção de parentesco.
132 Entretanto, não se sabe qual a fonte de informação do parentesco, se no córion
133 do ovo e/ou no próprio embrião em desenvolvimento.
134 Assim, o objetivo desse trabalho é testar experimentalmente onde estaria a
135 informação para reconhecimento no ovo, se no córion (que tem origem apenas
136 materna) e/ou no embrião. Os resultados encontrados serão discutidos tendo
137 em vista os possíveis ganhos nutricionais, bem como a oportunidade de
138 encontro entre os imaturos.

139

140

MATERIAL E MÉTODOS

141

142

143 *Manutenção de ovos, lagartas e adultos*

144

145 A manutenção dos adultos da borboleta *Heliconius erato phyllis* foi feita em
146 viveiros com cerca de 2 m x 2 m x 3 m, em área adjacente ao Departamento de
147 Genética da UFRGS (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) cujo interior é
148 composto de muitas plantas para simular as condições naturais, incluindo
149 *Passiflora misera*, *P. suberosa* e *P. capsularis*, plantas em que as fêmeas de *H.*
150 *erato phyllis* ovipositam, e das quais as lagartas se alimentam. Os ovos
151 coletados e as lagartas foram acondicionados em potes plásticos translúcidos
152 com tampa branca, a uma temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.
153 No estágio larval os animais se alimentaram exclusivamente de *Passiflora*
154 *suberosa*. A alimentação das borboletas foi feita diariamente, através de
155 recipientes contendo uma mistura de água, mel e pólen.

156

157 *Comportamento de lagartas e fonte do sinal de reconhecimento de parentesco*

158

159 O protocolo de testes consiste na disposição de duas lagartas de diferentes
160 ínstaes (1° X 3° e 2° X 4°), separadas por 0,5 cm de distância em um ramo de
161 *Passiflora suberosa* sem folhas, preso horizontalmente a uma placa de petri de
162 diâmetro de 10 cm e altura de 1,5 cm conforme Figura 1. O objetivo da
163 diferença de ínstaes entre as lagartas testadas é a assimetria de tamanho
164 (Figura 2).

165 Os testes consistem em cinco observações sequenciais, com duração
166 de até 10 minutos, do comportamento das duplas de lagartas. Em cada
167 observação foram anotadas as ocorrências das seguintes categorias
168 comportamentais: indiferença, fuga, hostilidade, ataque e canibalismo. O
169 comportamento descrito aqui como indiferença é caracterizado pelo fato de as

170 lagartas “ignorarem” a presença da outra, ficando paradas ou seguindo no
171 sentido em que foram postas. O comportamento “fuga” ocorria quando a
172 lagarta ia em sentido oposto depois do encontro, geralmente após um ataque
173 sofrido, ou ao comportamento hostil da outra lagarta. “Hostilidade” ocorria
174 quando a lagarta levantava a região anterior do corpo agitando-a, como um
175 tremor. “Ataque” foi caracterizado quando havia um movimento agressivo na
176 direção da outra, que podia ou não resultar em ferimento. “Canibalismo”, por
177 sua vez, ocorreu quando a lagarta foi atacada e canibalizada. Entre lagartas de
178 1º e 3º ínstaes foram feitas 15 repetições entre irmãos e 15 repetições entre
179 não-irmãos; o mesmo procedimento foi feito para lagartas de 2º e 4º ínstaes. A
180 frequência de cada categoria comportamental foi somada entre as repetições
181 de irmãos (somando as repetições de lagartas de 1º e 3º ínstar com as de 2º e
182 4º ínstar, correspondendo portanto a um tamanho amostral de 30) e entre
183 repetições de não-parentes (também somando lagartas de 1º e 3º ínstar com
184 as de 2º e 4º ínstar, N = 30). Os resultados foram tomados em conjunto porque
185 não houve diferença estatística na frequência dos comportamentos entre
186 irmãos e não-parentes em nenhum dos pares de lagartas.

187 Em cada uma das 60 repetições realizadas, a ocorrência dos
188 comportamentos foi somada nas cinco observações, de até 10 minutos cada,
189 sendo que em cada uma das observações mais de um comportamento poderia
190 ocorrer. Contabilizou-se apenas a ocorrência do comportamento (indiferença,
191 fuga, hostilidade, ataque e canibalismo), independentemente de este ter sido
192 executado pela lagarta maior ou menor. A análise estatística foi feita para cada
193 categoria comportamental, uma por uma, nos quatro tratamentos através do
194 teste de Kruskal-Wallis. A hipótese nula foi a de que em todos os casos as

195 lagartas não discriminam irmãos de não-parentes, ou seja, que não há
196 reconhecimento.

197

198

199 RESULTADOS

200

201

202 A Tabela 1 mostra os resultados absolutos de cada
203 comportamento obtidos a partir dos 60 testes com lagartas de diferentes
204 instares (1^o x 3^o e 2^o x 4^o). Além disso, a frequência de canibalismo é baixa
205 (cerca de 12%), independentemente de serem irmãos ou não-parentes (sete
206 casos de canibalismo em 60 testes).

207

208 A Tabela 2 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa
209 entre os tratamentos dentro de cada categoria comportamental.

210

211 Esses resultados suportam a hipótese de que as lagartas não tratam
212 parentes diferencialmente. Evidenciam, assim, que o sinal para
213 reconhecimento de parentesco não permanece depois da eclosão, o que
214 fornece indícios de que está no córion do ovo.

215

216

217

DISCUSSÃO

218

219

220 De acordo com os resultados dos experimentos, as lagartas não se
221 comportam diferencialmente com parentes e não-parentes. Esses resultados
222 mostram que as lagartas não reconhecem outras lagartas como irmãos
223 biológicos independente do ínstar e fornecem evidências de que o sinal
224 utilizado para o reconhecimento de parentesco em *Heliconius erato phyllis* não
225 está nas lagartas. Isso sugere que está no córion do ovo, uma vez que há
226 reconhecimento lagarta-ovo.

227 Ainda que não se possa determinar precisamente o significado ecológico
228 e evolutivo do não-reconhecimento entre lagartas, acredita-se que existam
229 implicações, já que na natureza, quando há poucos recursos alimentares,
230 pode-se observar lagartas, inclusive de diferentes ínstars, nas mesmas folhas.
231 Isso sugere que a competição possa ocorrer em determinados ambientes ou
232 em períodos de escassez de recursos alimentares - o que ocorre todos os anos
233 no começo do outono quando há poucas passifloras à disposição.

234 A ocorrência de canibalismo entre lagartas é cerca de 12%, muito menor
235 do que a mostrada para lagarta-ovo que é de pelo menos 50% (DE NARDIN &
236 ARAÚJO 2011). Embora as metodologias empregadas sejam diferentes, pois em
237 um caso trata-se da interação de uma lagarta com um ovo que está inerte e no
238 outro as duas lagartas interagindo, o tempo utilizado para os experimentos é
239 semelhante, menos de uma hora, sendo assim possível fazer uma comparação
240 da frequência de canibalismo entre eles. O fato de o canibalismo lagarta-ovo
241 ser mais comum do que o entre lagartas explica porque o reconhecimento de

242 parentesco só ocorre entre lagarta-ovo e a importância do reconhecimento dos
243 ovos como parentes para a seleção de parentesco.

244 Invertebrados são usados como modelo para o estudo sobre
245 agressividade intraespecífica, pois apresentam sistemas comportamentais
246 padronizados e facilmente identificáveis. Esses comportamentos oportunizam a
247 quantificação da agressividade, o que facilita o entendimento das relações de
248 dominância e hierarquia para explorar o significado neural e os mecanismos
249 neuroquímicos e genéticos subjacentes a esses fenômenos
250 comportamentais (KRAVITZ et al. 2003). Entretanto a agressividade
251 intraespecífica foi poucas vezes relatada em larvas de Lepidoptera. Foram
252 encontrados poucos trabalhos que citam essas interações e apenas em GREEN
253 et al. (1998) foi feito protocolo de análise. Contudo nesse trabalho não foram
254 criadas categorias comportamentais, apenas se definiu interação agressiva.
255 Portanto os protocolos elaborados no presente estudo podem servir de base
256 para pesquisas futuras sobre agressividade em larvas de Lepidoptera. Além
257 disso, os resultados aqui encontrados referendam a ideia de que invertebrados
258 são bons modelos para estudo sobre agressividade, pois os comportamentos
259 observados em *Heliconius erato phyllis* são facilmente categorizáveis,
260 estereotipados e bastante semelhantes aos de outros invertebrados.

261 Há uma grande literatura em insetos sociais, que emprega ensaios
262 comportamentais de agressividade semelhantes ao teste usado neste estudo
263 (JUTSUM et al. 1979; GRANGIER et al. 2007; ABRIL & GÓMEZ 2010), alguns
264 inclusive relacionando a agressividade ao reconhecimento (ADAMS 1991;
265 ERRARD & HEFETZ 1997; STUART & HERBERS 2000; TSUTSUI et al. 2003; LALZAR
266 et al. 2009). Para insetos não-sociais se adotou protocolo semelhante em

267 WCISLO (1997), neste caso para entender as interações sociais das abelhas
268 solitárias da espécie *Lasioglossum figueresi* (Família Halictidae).

269 Sobre a relação entre o canibalismo de ovos e o canibalismo larval,
270 MICHAUD & GRANT (2004) sustentaram que há muitas razões para esperar que o
271 significado adaptativo deles seja muito diferente. Por exemplo, outro estudo
272 (MICHAUD, 2003) mostrara que o benefício nutricional do canibalismo de ovos é
273 maior do que o canibalismo larval em três espécies de Coccinellidae (Ordem
274 Coleoptera). Essa diferença provavelmente surge porque a proteína contida
275 nos ovos está em estado menos diferenciado do que nas larvas e é mais
276 eficientemente assimilada. Larvas são capazes de comportamento defensivo
277 ou evasivo, e isso aumenta o risco e/ou o custo do canibalismo larval relativo
278 ao canibalismo de ovos. Assim, é razoável esperar que a rede de benefícios do
279 canibalismo de ovos seja maior do que a rede de benefícios do canibalismo de
280 larvas. FOX (1975) também menciona que a necessidade por proteínas pode
281 ser relacionada ao canibalismo entre herbívoros e granívoros. Supõe-se
282 geralmente que os ovos são altamente nutritivos, já que eles são providos pela
283 mãe com o vitelo para alimentar a larva embriônica em desenvolvimento. Ovos
284 podem, então, ser considerados como fonte alimentar de alta qualidade que se
285 ajusta às necessidades nutricionais dos neonatos melhor do que outras dietas
286 (EICKWORT 1973; MICHAUD & GRANT 2004). No caso de *H.e.phyllis* do presente
287 estudo, não se tem estas informações, nem foi feito um acompanhamento dos
288 efeitos do canibalismo de lagartas. No entanto, tendo em vista os resultados
289 encontrados, parece justo considerar algo semelhante.

290 A relação entre canibalismo e reconhecimento de parentesco em
291 Lepidoptera foi encontrada até o momento apenas em *Heliconius erato phyllis*

292 (DE NARDIN & ARAÚJO 2011), tendo sido também investigada em HARE & EISNER
293 (1995), onde não foram encontradas evidências de reconhecimento de
294 parentesco. Portanto não há literatura específica para Ordem Lepidoptera na
295 qual possamos orientar a análise.

296 Há alguns trabalhos com outros insetos que abordam a questão de onde
297 está o sinal de reconhecimento de parentesco. LIZÉ et al. (2006, 2010)
298 mostraram que em *Aleochara bilineata* (um coleóptero parasitóide) um sinal de
299 reconhecimento químico de parentesco está no *plug* feito pela larva de primeiro
300 ínstar para fechar o buraco de entrada no pupário do hospedeiro. Já resultados
301 de GIRON & STRAND (2004) indicam que larvas conhecidas como “soldados” de
302 *Copidosoma floridanum* (himenóptero parasitóide) distinguem parentes de não-
303 parentes por sua membrana extraembriônica, que é também essencial para
304 defesa contra resposta imune celular do hospedeiro. LIHOREAU & RIVAULT
305 (2009), em trabalho realizado com a barata social *Blattella germanica*,
306 mostraram que o parentesco influencia a escolha de parceiros sociais pelas
307 ninfas. O fato de que as ninfas discriminam irmãos de não-parentes somente
308 quando tem contato antenal com elas mostra que marcas de discriminação de
309 parentesco não são detectadas à distância, mas são necessariamente
310 percebidas através de contato.

311 KLOWDEN (2007) refere um *imprinting* espécie-específico na superfície
312 interna do córion, o que se acredita que poderia ser extrapolado para um
313 *imprinting* “irmandade-específico” no caso de *H.e.phyllis*. Em insetos sociais,
314 sistemas de reconhecimento têm sido extensivamente estudados e são
315 tipicamente baseados em marcas químicas (NEHRING et al 2011). Alguns
316 trabalhos sustentam que a discriminação por insetos é geralmente mediada por

317 diferenças nos perfis individuais de hidrocarbonetos cuticulares. Esses
318 compostos protegem os insetos da perda de água e atuam como barreira
319 contra microorganismos. Eles também sinalizam o status reprodutivo,
320 fertilidade, qualidade da prole e membros da ninhada (nest). Eles são mais
321 similares entre parceiros de ninhada do que não-parceiros em formigas e
322 abelhas, e presumivelmente funcionam no reconhecimento de parceiros de
323 ninhada. Em adição, sua variabilidade tem sido repetidamente correlacionada
324 com parentesco genético, sugerindo que eles podem codificar informação
325 sobre parentesco e podem funcionar no reconhecimento de parentesco (SORO
326 et al. 2011). Processos de reconhecimento baseados em componentes
327 geneticamente derivados são essenciais para determinar o grau de parentesco
328 para seleção de parentesco (revisado por BREED & BENNETT 1987; DRONNET et
329 al 2006). Além de trabalhos com insetos, GRINSTED et al. (2011), em estudo
330 realizado com aranhas sociais *Stegodyphus lineatus*, mostrou que os perfis
331 químicos cuticulares dessas aranhas variam significativamente entre grupos de
332 irmãos, independentemente da idade ou condições de criação. Isso sugere que
333 o perfil de hidrocarbonetos cuticulares carrega informações sobre o parentesco
334 e então pode potencialmente ser usado como marcas de reconhecimento de
335 parentesco. Uma análise detalhada do perfil químico do córion do ovo de *H.*
336 *erato phyllis* seria necessária para determinar se o sinal de reconhecimento de
337 parentesco no ovo são também os hidrocarbonetos.

338 Para concluir, os resultados aqui relatados indicam pelo menos dois
339 tópicos para futuras investigações: a natureza química do reconhecimento e as
340 implicações do ganho nutricional de lagartas canibais.

341

AGRADECIMENTOS

342

343

344 Agradecemos aos integrantes do laboratório de Genética Ecológica que
345 colaboraram com a criação das borboletas e imaturos durante este estudo (Ana
346 Carolina Bahi Aymone, André Klein, Luciana Oro da Silva, Marcelo Costa e
347 Mariana Pereira Giozza).

348

349 Agradeço especialmente aos meus orientadores, Aldo Mellender de
350 Araújo e Janaína De Nardin, pelo apoio teórico, disponibilidade e incentivo
351 durante a realização deste trabalho.

352

REFERÊNCIAS

353

354

355 ABRIL S. & GOMEZ C. 2010. Aggressive behaviour of the two European
356 Argentine ant supercolonias (Hymenoptera: Formicidae) towards displaced
357 native ant species of the northeastern Iberian Peninsula. *Myrmecology*
358 *News* 14: 99-106.

359 ADAMS E.S. 1991. Nest-mate recognition based on heritable odors in the termite
360 *Microcerotermes arboreus*. *PNAS* 88: 2031-2034.

361 BREED M.D. & BENNETT B. 1987. Kin recognition in highly eusocial insects, pp.
362 243-285. In: Fletcher D.J.C. & Michener C.D., Eds. Kin recognition in
363 animals. *Chichester. John Wiley and Sons*.

364 BUKACIŃSKI, D., M. BUKACIŃSKA & T. LUBJUHN. 2000. Adoption of chicks and the
365 level of relatedness in Common Gull *Larus canus* colonies: DNA
366 fingerprinting analyses. *Animal Behaviour* 59: 289–299

367 DE NARDIN J. & ARAÚJO A.M. 2011. Kin recognition in immatures of *Heliconius*
368 *erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Journal of Ethology* 29: 499–503.

369 DE NARDIN J. 2012. A evolução dos comportamentos canibal e não-canibal em
370 imaturos de *Heliconius erato phyllis* e evidências da herança do
371 reconhecimento de parentesco lagarta-ovo. Dissertação.

372 DRONNET S., LOHOU C., CHRISTIDES J.P. & BAGNÈRES A.G. 2006. Cuticular
373 hydrocarbon composition reflects genetic relationship among colonies of the
374 introduced termite *Reticulitermes santonensis* Feytaud. *Journal of Chemical*
375 *Ecology* 32: 1027–1042.

376 DUDLEY S.A. & FILE A.L. 2007. Kin recognition in an annual plant. *Biology*
377 *Letters* 3: 435–438.

378 EICKWORT K.R. 1973. Cannibalism and kin selection in *Labidomera clivivollis*
379 (Coleoptera: Chrysomelidae). *The American Naturalist* 107: 452–453.

380 ERRARD C. & HEFETZ A. 1997. Label familiarity and discriminatory ability of ants
381 reared in mixed groups. *Insectes Sociaux* 44: 189–198.

382 FOX L.R. 1975. Cannibalism in natural populations. *Annual Review of Ecology*
383 *and Systematics* 6: 87-106.

384 GERLACH, G., & LYSIAK, N. (2006). Kin recognition and inbreeding avoidance
385 in zebrafish, *Danio rerio*, is based on phenotype matching. *Animal Behaviour*,
386 71: 1371-1377.

- 387 GIRON D. & STRAND M.R. 2004. Host resistance and the evolution of kin
388 recognition in polyembryonic wasps. *Proceedngs of the Royal Society of*
389 *London (Series B, Biological Sciences) (Suppl.)* 27: S395–S398.
- 390 GRANGIER J., LE BRETON J., DEJEAN A. & HORRIBLE J. 2007. Coexistence
391 between *Cyphomyrmex* ants and dominant populations of *Wasmannia*
392 *auropunctata*. *Behavioural Processes* 74: 93–96.
- 393 GREEN W.W., MIRZA R.S. & PYLE G.G. 2008. Kin recognition and cannibalistic
394 behaviour by adult male fathead minnows (*Pimephales promelas*).
395 *Naturwissenschaften* 95: 269–272.
- 396 GREEN, E. S., ZANGERL, A. R., & BERENBAUM, M. R. 1998. Reduced aggressive
397 behavior: a benefit of silk-spinning in the parsnip webworm, *Depressaria*
398 *pastinacella* (Lepidoptera: Oecophoridae). *J. Insect Behav.* 11:761–772.
- 399 GRIFFITHS, S. W. AND ARMSTRONG, J. D.. 2000. Differential responses of kin and
400 nonkin salmon to patterns of water flow: does recirculation influence
401 aggression?. *Anim. Behav.* **59**: 1019–1023
- 402 GRINSTED L., BILDE T. & D'ETTORRE P. 2011. Cuticular hydrocarbons as potential
403 kin recognition cues in a subsocial spider. *Behavioral Ecology*, doi:
404 [10.1093/beheco/arr105](https://doi.org/10.1093/beheco/arr105).
- 405 HARE J.F. & EISNER T. 1995. Cannibalistic caterpillars (*Utetheisa ornatix*;
406 Lepidoptera: Arctiidae) fail to differentiate between eggs on the basis of
407 kinship. *Psyche* 102: 27–33.
- 408 HOLMES, W. G. & SHERMAN, P. W. 1982. *The ontogeny of kin recognition in two*
409 *species of ground squirrels. American Zoologist* 22, 491-517.

- 410 HOLMES W.G. 2004. The early history of Hamiltonian based research on kin
411 recognition. *Annales Zoologici Fennici* 41: 691–711.
- 412 HOKIT, D. G., WALLS, S. C. AND BLAUSTEIN, A. R. 1996. Context-dependent kin
413 discrimination in larvae of the marbled salamander, *Ambystoma*
414 *opacum*. *Anim. Behav.* **52**: 17–31
- 415 JUTSUM A.R., SAUNDERS T.S. & CHERRETT J.M. 1979. Intraspecific aggression is
416 the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Animal Behaviour* 27: 839-
417 844.
- 418 KLOWDEN M. J. 2007. *Physiological Systems in Insects*. 2nd ed. Moscow:
419 Academic Press.
- 420 KRAVITZ EA, HUBER R. *Aggression in invertebrates*. *Curr Opin Neurobiol.* 2003
421 Dec; 13(6):736-43.
- 422 KRUCZEK M. 2007. Recognition of kin in bank voles (*Clethrionomys glareolus*).
423 *Physiology & Behavior* 90: 483–489.
- 424 LALZAR I., SIMON T., VANDER MEER R.K. & HEFETZ A. 2009. Alteration of cuticular
425 hydrocarbon composition affects heterospecific nestmate recognition in the
426 carpenter ant *Camponotus fellah*. *Chemoecology* 20: 19–24.
- 427 LENA JP, DE FRAIPONT M, 1998. Kin discrimination in the common lizard. *Behav*
428 *Ecol Sociobiol* 42:341-347
- 429 LIHOREAU M. & RIVAUULT C. 2009. Kin recognition via cuticular hydrocarbons
430 shapes cockroach social life. *Behavioral Ecology* 20: 46–53.
- 431 LIZÉ A., CARVAL D., CORTESERO A.M., FOURNET S. & POINSOT D. 2006. Kin
432 discrimination and altruism in the larvae of a solitary insect. *Proceedngs of*

433 *the Royal Society of London (Series B, Biological Sciences)* 273: 2381–
434 2386.

435 LIZÉ A., CORTESERO, A.M., BAGNÈRES A.G. & POINSOT D. 2010. Kin recognition
436 in the larvae of a solitary insect: the cue is in the plug. *Behavioral Ecology*
437 21: 633–638.

438 MATEO J.M. 2004. Recognition systems and biological organization: the
439 perception component of social recognition. *Annales Zoologici Fennici* 41:
440 729–745.

441 MEHDIABADI N.J., JACK C.N., FARNHAM T.T., PLATT T.G., KALLA S.E., SHAULSKY
442 G., QUELLER D.C. & STRASSMANN J.E. 2006. Kin preference in a social
443 microbe. *Nature* 442: 881–882.

444 MEHDIABADI N.J., KRONFORST M.R., QUELLER D.C. & STRASSMANN J.E. 2008.
445 Phylogeny, reproductive isolation and kin recognition in the social amoeba
446 *Dictyostelium purpureum*. *Evolution* 63: 542–548.

447 MEHLIS M., BAKKER T.C.M., ENGQVIST L. & FROMMEN J.G. 2010. To eat or not to
448 eat: egg-based assessment of paternity triggers fine-tuned decisions about
449 filial cannibalism. *Proceedings of the Royal Society of London (Series B,*
450 *Biological Sciences)* 277: 2627–2635.

451 MICHAUD J.P. 2003. A comparative study of larval cannibalism in three species
452 of ladybird. *Ecological Entomology* 28: 92–101.

453 MICHAUD J.P. & GRANT A.K. 2004. Adaptive significance of sibling egg
454 cannibalism in Coccinellidae: comparative evidence from three species.
455 *Annals of the Entomological Society of America* 97: 710–719.

456 MOORE J. 2007. Perspective: Phenotype matching and inbreeding avoidance in
457 African elephants. *Molecular Ecology* 16: 4421–4423.

458 NEHRING V., EVISON S. E. F., SANTORELLI L. A., D’ETTORRE P. & HUGHES W. H. O.
459 477 2011. Kin-informative recognition cues in ants. *Proceedings of the*
460 *Royal Society B*, 278: 1942-1948.

461 OSTROWSKI E.A., KATOH M., SHAULSKY G. & QUELLER D.C., STRASSMANN, J.E.,
462 2008. Kin discrimination increases with genetic distance in a social amoeba.
463 *PLoS Biology* 6: 2376–2382.

464 PATTERSON L., DICK J.T.A. & ELWOOD R.W. 2008. Embryo retrieval and kin
465 recognition in an amphipod (Crustacea). *Animal Behaviour* 76: 717–722.

466 PRAVOSUDOVA EV, GRUBB TC JR, PARKER PG (2001) The influence of kinship on
467 nutritional condition and aggression levels in winter social groups of Tufted
468 Titmice. *Condor* 103:821–828.

469 SCHNEIDER J.M. & BILDE T. 2008. Benefits of cooperation with genetic kin in a
470 subsocial spider. *PNAS* 105: 10843–10846.

471 SHARP S.P., MCGOWAN A., WOOD M.J. & HATCHWELL B.J. 2005. Learned kin
472 recognition cues in a social bird. *Nature* 434: 1127–1130.

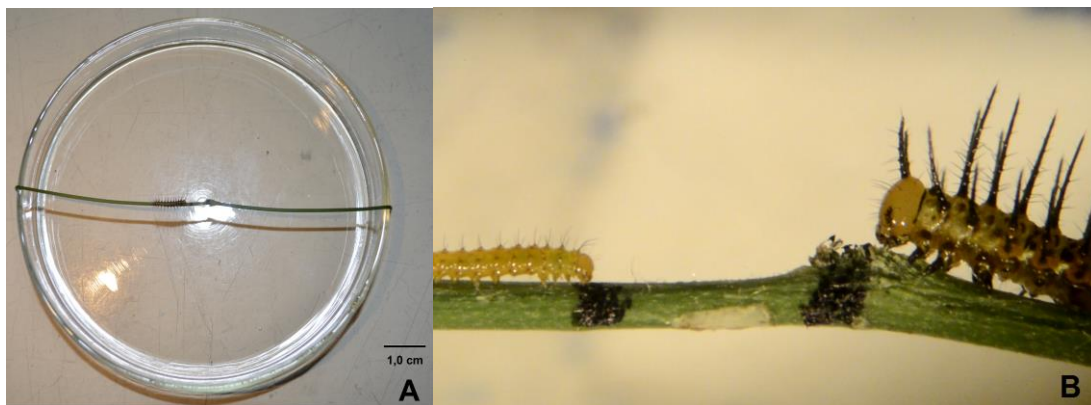
473 SHERBORNE A.L., THOM M.D., PATERSON S., JURY F., OLLIER W.E.R., STOCKLEY
474 P., BEYNON R.J. & HURST J.L. 2007. The genetic basis of inbreeding
475 avoidance in house mice. *Current Biology* 17: 2061–2066.

476 SORO A., AYASSE M., ZOBEL M. U. & PAXTON R. J. 2011. Kin discriminators in the
477 eusocial sweat bee *Lasioglossum malachurum*: the reliability of cuticular
478 and Dufour’s gland odours. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65, 641–
479 653.

- 480 STUART R.J. & HERBERS J.M. 2000. Nest mate recognition in ants with complex
481 colonies: within- and between-population variation. *Behavioral Ecology* 11:
482 676–685.
- 483 TSUTSUI N.D., SUAREZ A.V. & GROSBURG R.K. 2003. Genetic diversity,
484 asymmetrical aggression, and recognition in a widespread invasive species.
485 *PNAS* 100: 1078–1083.
- 486 WALDMAN B (1988) The ecology of kin recognition. *Am Rev Syst* 19:543±571.
- 487 WCISLO W.T. 1997. Social interactions and behavioral context in a
488 largely solitary bee, *Lasioglossum (Dialictus) figueresi* (Hymenoptera,
489 Halictidae). *Insectes Sociaux*. 44: 199–208.
- 490

491 Figura 1- Lagartas em posição inicial: A- Lagartas de diferentes ínstares,
492 separadas por 0,5 cm de distância em um ramo de *Passiflora suberosa* sem
493 folhas, preso horizontalmente a uma placa de petri de diâmetro de 10 cm e
494 altura de 1,5 cm (barra de 1,0 cm); B- Detalhe da posição inicial das
495 lagartas.

496



497

498

499 Figura 2- Assimetria de tamanho entre lagartas de diferentes ínstares. Neste
500 caso, a foto mostra a proporção entre lagartas de 1° e 3° íntares. Não dispomos
501 de imagens de lagartas de 2° e 4° instares juntas.



502

503

504 Tabela 1 – Frequência absoluta de cada categoria comportamental, no total
505 das repetições realizadas, para irmãs e não-parentes, independentemente da
506 comparação entre ínstares.

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

507

508

509 Tabela 2 – Mediana (extensão) dos diferentes comportamentos observados
 510 nos quatro grupos experimentais. A sexta coluna (*P*) indica a probabilidade da
 511 hipótese nula para cada comportamento, o teste utilizado foi o de Kruskal-
 512 Wallis.

Comportamento	Irmãos (1° – 3° ístar)	Irmãos (2° – 4° ístar)	Não- parentes (1° – 3° ístar)	Não- parentes (2° – 4° ístar)	<i>P</i>
Indiferença	3 (0 – 8)	3 (0 – 10)	4 (1 – 10)	5 (0 – 7)	0.741
Fuga	2 (1 – 4)	2 (0 – 5)	2 (0 – 4)	2 (0 – 4)	0.736
Hostilidade	1 (0 – 4)	2 (0 – 8)	2 (0 – 5)	2 (0 – 10)	0.336
Ataque	3 (0 – 8)	4 (0 – 9)	3 (0 – 7)	4 (1 – 8)	0.297
Canibalismo	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0.924

513

ANEXO:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Ethology Ecology & Evolution

An experimental approach to test the source of information on kinship in butterfly immatures

J. DE NARDIN ^{1,2}, B. O. MISSAGGIA ¹ and A.M. ARAÚJO ^{1,2}

¹ *Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brazil*

² *Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

Corresponding author: Aldo Mellender de Araújo, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43323, sala 207, CEP 91501-970, Cx. Postal 15053, Porto Alegre, RS, Brazil (E-mail: aldo1806@gmail.com).

Short title: Information on kinship in butterfly immatures

21 This study focus on a non-social species of butterfly of the Neotropical genus
22 *Heliconius*, *H. erato phyllis*, where caterpillar-egg cannibalism may occur. In this
23 species, newly hatched caterpillars are able to recognize sibling eggs, preferentially
24 cannibalizing unrelated, when there is a choice. The purpose of this study was to verify
25 whether the information to recognize the egg as sibling or non-kin, is in the chorion
26 (maternal origin) and/or in the embryo/young caterpillar, by performing both caterpillar-
27 egg and caterpillar-caterpillar cannibalism tests. The results of these tests suggest that
28 the signal evaluated to recognize kinship is in the egg chorion, not in the caterpillar
29 itself. We discuss these findings in the light of possible nutritional gain and the
30 opportunity of encounters of immatures in a non-social butterfly.

31

32

33 KEY WORDS: cannibalism; egg chorion; *Heliconius*; kin recognition; Lepidoptera, signal
34 for recognition.

35

36

INTRODUCTION

37

38

39

40 Kin recognition, the capacity of distinguishing kin from non-kin using genetic
41 similarity or any cue that is correlated with kinship (HOLMES 2004), has been evidenced
42 in several animal species, both vertebrate (SHARP et al. 2005; KRUCZEK 2007; MOORE
43 2007; SHERBORNE et al. 2007; GREEN et al. 2008; MEHLIS et al. 2010) and invertebrate
44 (LIZÉ et al. 2006; PATTERSON et al. 2008; SCHNEIDER & BILDE 2008; DE NARDIN &
45 ARAÚJO 2011), in plants (DUDLEY & FILE 2007), and also in mycetozoa (MEHDIABADI et
46 al. 2006, 2008; OSTROWSKI et al. 2008).

47 The process of kinship recognition involves three components: (1) the
48 expression of unique phenotypic cues, (2) the perception of these cues and the degree
49 of correspondence with the recognition template, and (3) the action taken by the
50 evaluator as a function of the perceived similarity between the model and the
51 phenotype found (LIEBERT & STARKS 2004; MATEO 2004; TSUTSUI 2004).

52 The cues used to discriminate kin from unrelated may be visual, auditory or
53 olfactory. The production of a cue that indicates the sender's identity is important, since
54 it can mediate kinship recognition and then have a significant impact on the sender's
55 fitness, benefiting it with acts of altruism (LIZÉ et al. 2010). One question that could be
56 raised about kin recognition is about its evolutionary significance. According to
57 HAMILTON (1964), individuals may benefit from behaving altruistically with their kin, thus
58 increasing their inclusive fitness. He suggested that altruism could evolve whenever the
59 condition $r.b - c > 0$ be satisfied; in this inequality, c is the cost of an altruistic
60 behaviour towards a relative, b is the benefit of the recipient, and r is the biological
61 relationship between them. There is a vast literature on this subject, both theoretical

62 and empirical; the papers by GARDNER et al. (2011), and DOBLER & KÖLLIKER (2010),
63 are representatives of each approach.

64 The genus *Heliconius*, with about 40 species, represents a well known group of
65 Neotropical butterflies. This genus has a notoriously behavioural complexity, as for
66 instance, the use of pollen as a food source, the memorization of their resting place,
67 which can be kept for months, in those species that form gregarious roost at evening,
68 among others (GILBERT 1975). It has been intensely studied on a diversity of
69 evolutionary problems as evo-devo (FERGUSON & JIGGINS 2009), genomics
70 (COUNTERMANN et al. 2010), natural and sexual selection (CARDOSO et al. 2009; KLEIN
71 & ARAÚJO 2010), mimicry (MOURA et al. 2011), and morphometry, both traditional and
72 geometric (JORGE et al. 2011), among other subjects. At the very south of Brazil (State
73 of Rio Grande do Sul), the species *Heliconius erato phyllis* is a common butterfly, flying
74 mainly from September-October until the end of May-June. Females lay individual eggs
75 on several species of *Passiflora*; around Porto Alegre, the capital of Rio Grande do Sul,
76 their main hostplants are *Passiflora suberosa* and *P. misera*.

77 Many authors comment that first instar caterpillars of *Heliconius erato* can
78 behave cannibalistic towards eggs (BROWN & MIELKE 1972; DEVRIES 1987). By the end
79 of the flight season in Southern Brazil, May-June, when host plants are well damaged
80 by caterpillar feeding behaviour, females may lay eggs close enough to facilitate
81 cannibalism (personal observations). We are studying this subject in recent years (DE
82 NARDIN & ARAÚJO 2011; and in preparation), because it is an excellent opportunity to
83 detect kin recognition and to test Hamilton's inequality, referred to above.

84 Newly hatched caterpillars of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera
85 Nymphalidae) recognize their full siblings, preferring to cannibalize unrelated eggs in
86 experiments where there is a choice. When only sibling eggs are available, the
87 frequency of cannibalism is significantly lower than when only unrelated eggs are

88 available (DE NARDIN & ARAÚJO 2011). However, the source of kinship information is
89 not known, whether in the egg chorion and/or in the resulting caterpillar.

90 Thus, the objectives of this study were (a) to test experimentally where the
91 information for recognition would be, whether in the egg chorion (its outer shell, which
92 is only of maternal origin) and/or in the young caterpillar (first instar); (b) to test whether
93 at other instars (especially cannibalism between 1st x 3rd and 2nd x 4th) there would
94 be also cues for recognition (our purpose in this case was to create size asymmetry).
95 We will discuss our findings in the light of possible nutritional gains as well as the
96 opportunity of encounters of immatures.

97

98

99 MATERIAL AND METHODS

100

101

102 *Keeping stocks of females*

103

104 Adults of *Heliconius erato phyllis* were collected in four different populations
105 around the city of Porto Alegre (30°1'40"S; 51°13'43"W). They were kept in open air
106 insectaries measuring about 2 x 2 x 3 m, in an area adjacent to the Department of
107 Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Inside there were many
108 plants to simulate natural conditions, including *Passiflora misera*, *P. suberosa* and *P.*
109 *capsularis*. The females of *H. erato phyllis* oviposit on these plants and the caterpillars
110 feed on them (in the present study, the caterpillars were fed only with *P. suberosa*).
111 The tests performed here used the offspring of these females. The butterflies were fed
112 daily through small containers in which there was a mixture of water, honey and pollen;

113 eggs were collected daily with the aid of paintbrushes, being transferred to appropriate
114 recipients for the different tests (see below).

115

116 *Is the kin recognition cue in the egg chorion or in the caterpillar?*

117

118 To verify whether the recognition cue in the egg is paternal/maternal in origin, or
119 from both, caterpillar-egg cannibalism tests were performed between half-siblings with
120 a common father. Females of *H. erato phyllis* are monandric (DRUMMOND 1984),
121 therefore it is not possible to perform cannibalism tests in half-siblings whose mother is
122 the same. It is known that the chorion originates in the maternal follicular cells (TELFER
123 2009). Thus, if the recognition signal is in the chorion, it could be expected that the
124 newly hatched caterpillars would not recognize their paternal half-sibling eggs as kin.
125 On the other hand, if the recognition signal is in the embryo, half-sibling recognition
126 could be expected, expressed by a lower frequency of cannibalism than that for
127 unrelated. For this to be true, the signal present in the embryo would have to go
128 beyond the chorion, which would be possible through the aeropyles, small openings in
129 the egg ribs (DELL'ERBA et al. 2005).

130 Mating was performed in an open air insectary where a same male copulated
131 with two females, all of them unrelated (for simplicity we called this mating a *trio*).
132 Seven repetitions of these matings were performed (seven *trios*; no male was used
133 more than once). From these fourteen females, a total of forty-three repeats were
134 analyzed.

135 For the cannibalism tests, the eggs were distributed on the vertices of an
136 equilateral triangle, made of green light cardboard, with side length of 0.5 cm, as in DE
137 NARDIN & ARAÚJO (2011). Two eggs from one female (full siblings) and one egg from
138 the other female (and thus a paternal half-sibling of the others) were used for each test.

139 The triangles were kept in Petri dishes, with an 8 cm diameter and 1.5 cm height, at
140 room temperature, on a paper towel, slightly moistened to prevent the eggs from
141 dehydrating. The variable analyzed, after the half-sibling caterpillar hatched, was
142 whether cannibalism of the remaining eggs (full siblings) occurred or not, during 45
143 min. Tests where one of the full sibling eggs hatched first were ignored, mainly due to
144 the small sample size (the information would be similar however).

145 The frequency of cannibalism observed was compared to the frequency of
146 cannibalism expected for full siblings and unrelated found in DE NARDIN & ARAÚJO
147 (2011); our null hypothesis was that half-sibling caterpillar-egg cannibalism would have
148 an intermediate frequency. The statistical analysis was done using a G-test of
149 independence with a Williams correction, through the BioEstat 5.0 program
150 (<http://www.mamiraua.org.br/download/>).

151

152 *Cannibalism among the caterpillars*

153

154 The test complementing the previous one was cannibalism among caterpillars,
155 which consisted of two steps: in the first, cannibalism among first instar caterpillars was
156 tested (N = 60) and, in the second, cannibalism among different instars (N = 60). Our
157 null hypothesis was that caterpillars do not recognize each other.

158 In the first step, cannibalism tests were performed among 1st instar caterpillars that
159 were siblings and caterpillars that were unrelated. This test was important because the
160 1st instar caterpillar is the equivalent of the embryonic larva that has come out of the
161 egg without undergoing the first molt. Two caterpillars with approximately the same
162 size, were placed together in translucent plastic pots, with a white lid (8.5 cm height x
163 7.5 cm in diameter) with plenty of young *Passiflora suberosa* leaves. The bottom of the
164 pot was covered with white absorbent paper to retain moisture. The end of the test

165 occurred when one of the caterpillars cannibalized the other, or until one of them did
166 molt for 2nd instar (although this was simply to mark out the end of the test,
167 cannibalism occurred much before, usually within 24-48 hr, which was less than the
168 average time to molt from the 1st to the 2nd instar: 3 to 4 days at 25 ± 1 °C;
169 unpublished results). This test was different from the one in 2.2 above, because when
170 first instar caterpillars hatch and do not find the hostplant for immediate feeding, they
171 start moving; in the present test we were interested that they remained close to each
172 other, so the host plant was added. The frequency of cannibalism of sibling caterpillars
173 (N = 30) and unrelated caterpillars (N = 30) was compared using a G test of
174 independence with a Williams correction.

175 In the second step, pairs of sibling or non-sibling caterpillars previously fed were
176 gently placed facing each other at a distance of 0.5 cm, on a leafless branch of
177 *Passiflora suberosa*, adhering horizontally to a Petri dish with a 10 cm diameter and
178 height of 1.5 cm without a lid. The pairs of caterpillars consisted of a 1st instar and a
179 3rd instar caterpillar, or a 2nd and a 4th instar. Each repetition consisted of five
180 observations lasting 10 min for each pair, sequentially. At each observation, the
181 occurrence of the following behavioural categories were noted: *indifference*, *escape*,
182 *hostility*, *attack* and *cannibalism*. The behaviour described here as *indifference* was
183 characterized by the fact that the caterpillars ignored the presence of the other, and
184 remained still or followed the direction in which they were placed, as if the presence of
185 another caterpillar was irrelevant. The *escape* behaviour occurred when the caterpillar
186 went in the opposite direction after the encounter, generally after suffering an attack, or
187 due to hostile behaviour by the other caterpillar. *Hostility* occurred when the caterpillar
188 raised the forward region of the body, shaking it as though in tremor. *Attack* was
189 characterized by an aggressive movement towards the other, which might or not result
190 in injury. *Cannibalism* occurred when the caterpillar was attacked and cannibalized.
191 Among the 1st and 3rd instar caterpillars, repetitions were made among siblings and

192 among non-siblings (N = 15, each); the same procedure was performed for 2nd and
193 4th instar caterpillars. The frequency of each behavioural category was added up
194 among the sibling repetitions and among unrelated repetitions. Each comparison, that
195 is between siblings of 1st x 3rd, and 2nd x 4th instars, as well as those for unrelated,
196 was considered a treatment.

197 In each of the 60 repetitions performed, the occurrence of the behaviour was
198 added up in the five repetitions, lasting 10 min each, and more than one behaviour
199 could occur during each of the observations. The aspects counted were the occurrence
200 of a specific behaviour (*indifference, escape, hostility, attack and cannibalism*),
201 independently of this having being carried out by the larger or the smaller caterpillar.
202 Statistical analysis was done for each category of behaviour, one by one in the four
203 treatments through a Kruskal-Wallis test. Our null hypothesis was that in any case,
204 caterpillars do not discriminate each other as siblings or non-kin (no recognition).

205

206

207 RESULTS

208

209

210 *Is the kin recognition cue in the egg chorion or in the caterpillar?*

211

212

213 Table 1 shows the frequency of cannibalism when the paternal half-sibling egg
214 hatched first in relation to the full-sibling eggs (see Material and Methods). The
215 observed frequencies of cannibalism are the sum of what was obtained for the seven
216 trios (male that copulated with two unrelated females). This was due because the

217 sample of eggs for some of the trios was too small for an individualized analysis.
218 However, all females contributed with offspring.

219 As can be seen, the total frequency of caterpillar-egg cannibalism observed in
220 this experiment was not different from the expected one for unrelated (G test
221 (Williams): 0.0109; $df = 1$; $P = 0.9167$). However, there was a statistical difference in
222 relation to the frequency of cannibalism observed for full siblings (G test (Williams):
223 12.9255; $df = 1$; $P = 0.0003$). This suggests that half-sibling caterpillars apparently do
224 not recognize the remaining eggs as relatives. One further point worth mentioning here:
225 as our previous paper (DE NARDIN & ARAÚJO 2011) used the same methodology as in
226 the present one, we believed it would be fair to compare the frequencies of cannibalism
227 between them.

228

229 *Cannibalism among caterpillars*

230

231 Table 2 shows the data of the 60 repetitions of cannibalism tests among 1st
232 instar caterpillars, by kinship group. There was no significant difference in the
233 frequencies of cannibalism among sibling and unrelated caterpillars. This, together with
234 the results from the previous paragraph, seems to indicate that the signal for the
235 recognition is not at the outer surface of a caterpillar.

236

237 As to the test with caterpillars of different instars (1st x 3rd and 2nd x 4th),
238 shown in Table 3, there was also no statistically significant difference between the
239 treatments within each behavioural category. More important, the frequency of
240 cannibalism is low (about 12%), irrespective of being siblings or unrelated (seven
241 cases of cannibalism occurred in 60 tests).

242 These results supply further evidence that caterpillars do not treat kin
243 differently, reinforcing the evidences that the kinship recognition cue is in the egg
244 chorion, as shown in Table 1.

245

246

247

DISCUSSION

248

249

250 Although there are many studies which report cannibalism in Lepidoptera
251 (SCHWEITZER 1979; RICHTER 1986; WATANABE & YAMAGUCHI 1993; PIERCE 1995;
252 WATANABE & OH'URA & 1997; CHAPMAN et al 1999a, 1999b, 2000; BARROS-BELLANDA &
253 ZUCOLOTO 2001, 2005; ZAGO-BRAGA & ZUCOLOTO 2004; WILLIAMS & HERNÁNDEZ
254 2006), few of them discuss cannibalism related to the recognition of kinship. This is
255 treated only in HARE & EISNER (1995), who found no evidence of kin recognition, and
256 DE NARDIN & ARAÚJO (2011), who found it.

257 The results presented here suggest, although indirectly, that the cue used for
258 kinship recognition is in the egg chorion. First instar caterpillars do not appear to
259 discriminate each other (Table 2), and the caterpillars of different instars also do not
260 behave differently towards kin. It is remarkable as well, that there were no differences
261 in any of the behavioural categories (Table 3), which stresses that kin and unrelated
262 caterpillars do not discriminate each other. Moreover, the frequency of cannibalism of
263 paternal half-sibling eggs is not different from the frequency of cannibalism expected
264 for unrelated (Table 1), increasing the probability that the recognition signal is in the
265 egg chorion, since this originates in the mother's follicular cells. Although the butterfly
266 *Heliconius erato phyllis* cannot be called social as adults (they only form gregarious
267 roosting at dusk – FINKBEINER et al. 2012), sometimes eggs can be laid in pairs or at a

268 short distance from each other (personal observations). This occurs mainly in
269 environments with limited amount of hostplants, or by the end of autumn, when there is
270 scarcity of plants; in such circumstances, cannibalism may occur. Oviposition female
271 behaviour, in *H. erato phyllis*, which consists of a careful inspection of the plant is
272 suggested as a mechanism to avoid ovipositing where another egg is present (GILBERT
273 1975; BENSON et al. 1976; BROWN 1981). WILLIAMS & GILBERT (1981) showed
274 experimentally that stipule tips evolved specifically to mimic *Heliconius* eggs in
275 *Passiflora cyanea* and *P. oerstedii*, inducing females of *Heliconius cydno* to lay fewer
276 eggs than in the absence of these. According to them, "larvae of many *Heliconius* feed
277 on congeneric eggs and larvae" (p. 467).

278 Although we did not test statistically, the frequency of caterpillar-egg cannibalism
279 is greater than the cannibalism among caterpillars of different instars. Cannibalism
280 between caterpillar and egg was at least 50%, independently of being siblings or
281 unrelated (DE NARDIN & ARAÚJO 2011) and among caterpillars of different instars it was
282 around 12% (present work). Although the methodology used in the cannibalism test
283 between first instar caterpillars covers a much longer time period (until a death
284 occurred or one of the caterpillars molted to the second instar, which on average
285 occurs every 3 days at 25 °C), in this test the frequency of cannibalism was also
286 greater than 50%.

287 First instar caterpillars are quite aggressive, probably because it is the most
288 vulnerable instar. Moreover, these data shows that egg/caterpillars cannibalism may be
289 important to eliminate competitors, since cannibalism occurred even in the presence of
290 the host plant. Both the caterpillar-egg cannibalism tests done by DE NARDIN & ARAÚJO
291 (2011) and the cannibalism test among caterpillars of different instars carried out in this
292 work last less than one hour, and it is thus possible to compare the frequency of
293 cannibalism among them. Since egg cannibalism is more frequent than cannibalism
294 among the caterpillars, this explains, at least in part, why only caterpillar-egg

295 recognition occurs, not between caterpillars. It is a fact that between first instar
296 caterpillars the frequency of cannibalism was also high, but in this case the time used
297 was much longer, and therefore the frequency of cannibalism is not totally comparable
298 to the other tests. However, this test showed for the first time the aggressiveness of
299 first instar caterpillars in non-social insects relating with kin recognition using
300 behavioural assays similar to others in the literature on social insects (JUTSUM et al.
301 1979; GRANGIER et al. 2007; ABRIL & GÓMEZ 2010), some of them even relating
302 aggressiveness with recognition (ADAMS 1991; ERRARD & HEFETZ 1997; STUART &
303 HERBERS 2000; TSUTSUI et al. 2003; LALZAR et al. 2009). For non-social insects, see
304 the paper by WCISLO (1997) which studied aggressive behaviour with familiarity
305 (kinship), in *Lasioglossum figueresi* (Halictidae).

306 There are some studies on other insects that discuss the issue of the location of
307 the kin recognition cue. LIZÉ et al. (2006, 2010) showed that in *Aleochara bilineata* (a
308 parasitoid beetle) a chemical signal to recognize kinship is in the plug made by the first
309 instar larva to close the hole into the host puparium. Results from GIRON & STRAND
310 (2004) indicate that larvae known as *Copidosoma floridanum* “soldiers”, distinguish kin
311 from unrelated through their extraembryonic membrane, which is also essential as a
312 defense against the cellular immune response of the host. LIHOREAU & RIVAULT (2009),
313 in a study performed with the social cockroach *Blattella germanica*, showed that kinship
314 influences the choice of social partners by the nymphs. The fact that nymphs
315 discriminate siblings from non-siblings only when they have antennae contact with
316 them shows that marks of kinship discrimination are not detected at a distance, but are
317 necessarily perceived through contact.

318 Recognition processes based on genetically derived components are essential
319 to determine the degree of kinship to select kin (revised by BREED & BENNETT 1987;
320 DRONNET et al. 2006). Due to this we are presently trying to characterize chemically the

321 source of information between the egg and first instar caterpillar (some papers refer to
322 cuticular hydrocarbons as in LIZÉ et al. 2010).

323 MICHAUD & GRANT (2004), who studied three species of Coleoptera, said that
324 there are many reasons to expect that the adaptive meaning of egg cannibalism in
325 Coccinellidae is very different from larval cannibalism. For instance, in another paper
326 (MICHAUD 2003) demonstrated that the nutritional benefit of egg cannibalism is greater
327 than that of larva cannibalism, in three species of Coccinellidae. In two cases the diet
328 of conspecific larvae significantly reduced survival and, in the three cases, the total
329 development time increased and the weight of the adult was diminished as compared
330 to the control diet. Conversely, the diet of conspecifics eggs improved survival and time
331 of development in a species (*Cycloneda sanguinea*), with no effect on the
332 developmental time and only a marginal reduction in adult weight resulting in the other
333 two. They argue that this difference probably arised because the protein contained in
334 the eggs is in a less differentiated state than in the larvae, and it is therefore more
335 efficiently assimilated. Larvae are able to behave defensively or evasively, and this
336 increases the risk and/or cost of larval cannibalism compared to egg cannibalism.
337 Thus, it is reasonable to expect that the network of benefits from egg cannibalism is
338 greater than the network of benefits from larval cannibalism. FOX (1975) also mentions
339 that the need for proteins can be related to cannibalism among herbivores and grain
340 eaters (granivores). It is generally assumed that eggs are highly nutritious, since the
341 mother provides them with the yolk to feed the developing embryonic larva. Eggs can
342 then be considered a source of high quality food which adapts to the nutritional needs
343 of the neonates better than the other diets (EICKWORT 1973; MICHAUD & GRANT 2004).
344 In the case of *H. erato phyllis* discussed in this study, this information is not available,
345 nor were the effects of caterpillar cannibalism followed up. However, it seems that in
346 our case something similar may be occurring.

347 In conclusion, the results here reported raise at least two points for future
348 research: the chemical nature of the recognition cue, as well as measures of nutritional
349 gain for cannibal caterpillars.

350

351

352

ACKNOWLEDGMENTS

353

354

355 We are grateful to our colleagues of the Ecological Genetics Laboratory who
356 cooperated in raising the butterflies and immatures during this study. To Rodrigo
357 De Nardin for all his help throughout this work, and to the Conselho Nacional de
358 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and for
359 granting a Master's scholarship to J. De Nardin. We also thank Programa de Pós-
360 Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) for general assistance
361 during the development of this work.

362

363

364

REFERENCES

365

366

367 ABRIL S. & GOMEZ C. 2010. Aggressive behaviour of the two European Argentine ant
368 supercolonias (Hymenoptera: Formicidae) towards displaced native ant species of
369 the northeastern Iberian Peninsula. *Myrmecology News* 14: 99-106.

- 370 ADAMS E.S. 1991. Nest-mate recognition based on heritable odors in the termite
371 *Microcerotermes arboreus*. *PNAS* 88: 2031-2034.
- 372 BARROS-BELLANDA H.C.H & ZUCOLOTO F.S. 2001. Influence of chorion ingestion on the
373 performance of *Ascia monuste* and its association with cannibalism. *Ecological*
374 *Entomology* 26: 557–561.
- 375 BARROS-BELLANDA H.C.H. & ZUCOLOTO F.S. 2005. Egg cannibalism in *Ascia monuste*
376 in the field; opportunistic, preferential and very frequent. *Journal of Ethology* 23:
377 133–138.
- 378 BENSON W.W., BROWN K.S. JR & GILBERT L.E., 1976. Coevolution of plants and
379 herbivores: passion flower butterflies. *Evolution* 29: 659-680.
- 380 BREED M.D. & BENNETT B. 1987. Kin recognition in highly eusocial insects, pp. 243-
381 285. In: Fletcher D.J.C. & Michener C.D., Eds. Kin recognition in animals.
382 *Chichester. John Wiley and Sons*.
- 383 BROWN K.S. JR 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual*
384 *Review of Entomology* 26: 427-456.
- 385 BROWN K.S. JR & MIELKE O.H.H. 1972. The heliconians of Brazil (Lepidoptera:
386 Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary
387 revision of the tribe. *Zoologica* 57: 1–40.
- 388 CARDOSO M.Z., ROPER J.J. & GILBERT L.E. 2009. Prenuptial agreements: mating
389 frequency predicts gift-giving in *Heliconius* species. *Entomologia Experimentalis et*
390 *Applicata* 131: 109–114.
- 391 CHAPMAN J.W., WILLIAMS T., ESCRIBANO A., CABALLERO P., CAVE R.D. & GOULSON D.
392 1999a. Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera*
393 *frugiperda*. *Behavioral Ecology* 10: 298–303.

394 CHAPMAN J.W., WILLIAMS T., ESCRIBANO A., CABALLERO P., CAVE R.D. & GOULSON D.
395 1999b. Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear
396 polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. *Ecological Entomology* 24:
397 268–275.

398 CHAPMAN J.W., WILLIAMS T., MARTÍNEZ A.M., CISNEROS J., CABALLERO P., CAVE R.D. &
399 GOULSON D. 2000. Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera,
400 Noctuidae) reduce the risk of predation? *Behavioral Ecology and Sociobiology*
401 48: 321–327.

402 COUNTERMAN B.A., ARAUJO-PEREZ F., HINES H.M., BAXTER S.W., MORRISON C.M.,
403 LINDSTROM D.P., PAPA R., FERGUSON L., JORON M., FRENCH-CONSTANT R., SMITH
404 C.P., NIELSEN D.M., CHEN R., JIGGINS C.D., REED R.D., HALDER G., MALLET J. &
405 MCMILLAN W.O. 2010. Genomic hotspots for adaptation: the population genetics of
406 mullerian mimicry in *Heliconius erato*. *PLOS Genetics* 6(2): e1000796.

407 DELL'ERBA R., KAMINSKI L.A. & MOREIRA G.R.P. 2005. O estágio de ovo dos Heliconiini
408 (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Zoologia*: 95:
409 29–46.

410 DE NARDIN J. & ARAÚJO A.M. 2011. Kin recognition in immatures of *Heliconius erato*
411 *phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Journal of Ethology* 29: 499–503.

412 DEVRIES P. 1987. Butterflies of Costa Rica and their natural history. *Princeton*:
413 *Princeton University Press*.

414 DOBLER R. & KÖLLIKER M. 2010. Kin-selected siblicide and cannibalism in the
415 European earwig. *Behavioural Ecology* 21: 257–263.

416 DRONNET S., LOHOU C., CHRISTIDES J.P. & BAGNÈRES A.G. 2006. Cuticular
417 hydrocarbon composition reflects genetic relationship among colonies of the

418 introduced termite *Reticulitermes santonensis* Feytaud. *Journal of Chemical*
419 *Ecology* 32: 1027–1042.

420 DRUMMOND B.A. III 1984. Multiple mating and sperm competition in the Lepidoptera,
421 pp. 291-370. In: Smith R.L., Ed. Sperm competition and the evolution of animal
422 mating systems. *London: Academic Press.*

423 DUDLEY S.A. & FILE A.L. 2007. Kin recognition in an annual plant. *Biology Letters* 3:
424 435–438.

425 EICKWORT K.R. 1973. Cannibalism and kin selection in *Labidomera clivivollis*
426 (Coleoptera: Chrysomelidae). *The American Naturalist* 107: 452–453.

427 ERRARD C. & HEFETZ A. 1997. Label familiarity and discriminatory ability of ants
428 reared in mixed groups. *Insectes Sociaux* 44: 189–198.

429 FERGUSON L.C. & JIGGINS C.D. 2009. Shared and divergent expression domains on
430 mimetic *Heliconius* wings. *Evolution & Development* 11: 498–512.

431 FINKBEINER S.D., BRISCOE, A.D. & REED R.D. 2012. The benefit of being a social
432 butterfly: communal roosting deters predation. *Proceedings of the Royal Society of*
433 *London (Series B, Biological Sciences)* 279: 2769-2776.

434 FOX L.R. 1975. Cannibalism in natural populations. *Annual Review of Ecology and*
435 *Systematics* 6: 87-106.

436 GARDNER A., WEST S.A. & WILD G. 2011. The genetical theory of kin selection.
437 *Journal of Evolutionary Biology* 24: 1020–1043.

438 GILBERT L.E. 1975. Ecological consequences of a coevolved mutualism between
439 butterflies and plants, pp. 210–240. In: Gilbert L.E. & Raven P.H., Eds. *Coevolution*
440 *of animals and plants. Austin: University of Texas Press.*

- 441 GIRON D. & STRAND M.R. 2004. Host resistance and the evolution of kin recognition in
442 polyembryonic wasps. *Proceedings of the Royal Society of London (Series B,*
443 *Biological Sciences) (Suppl.)* 27: S395–S398.
- 444 GRANGIER J., LE BRETON J., DEJEAN A. & HORRIBLE J. 2007. Coexistence between
445 *Cyphomyrmex* ants and dominant populations of *Wasmannia auropunctata*.
446 *Behavioural Processes* 74: 93–96.
- 447 GREEN W.W., MIRZA R.S. & PYLE G.G. 2008. Kin recognition and cannibalistic
448 behaviour by adult male fathead minnows (*Pimephales promelas*).
449 *Naturwissenschaften* 95: 269–272.
- 450 HAMILTON W.D. 1964. The genetical evolution of social behaviour. I. *Journal of*
451 *Theoretical Biology* 7: 1-16.
- 452 HARE J.F. & EISNER T. 1995. Cannibalistic caterpillars (*Utetheisa ornatix*; Lepidoptera:
453 Arctiidae) fail to differentiate between eggs on the basis of kinship. *Psyche* 102:
454 27–33.
- 455 HOLMES W.G. 2004. The early history of Hamiltonian based research on kin
456 recognition. *Annales Zoologici Fennici* 41: 691–711.
- 457 JORGE L.R., CORDEIRO-ESTRELA P., KLACZKO L.B., MOREIRA G.R.P. & FREITAS
458 A.L.V. 2011. Hostplant dependent wing phenotypic variation in the
459 neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biological Journal of the Linnean*
460 *Society* 102: 765–774.
- 461 JUTSUM A.R., SAUNDERS T.S. & CHERRETT J.M. 1979. Intraspecific aggression is the
462 leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Animal Behaviour* 27: 839-844.
- 463 KLEIN A.L. & ARAÚJO A.M. 2010. Courtship behaviour of *Heliconius erato Phyllis*
464 (Lepidoptera, Nymphalidae) towards virgin and mated females: conflict between
465 attraction and repulsion signals? *Journal of Ethology* 28: 409–420.

- 466 KRUCZEK M. 2007. Recognition of kin in bank voles (*Clethrionomys glareolus*).
467 *Physiology & Behavior* 90: 483–489.
- 468 LALZAR I., SIMON T., VANDER MEER R.K. & HEFETZ A. 2009. Alteration of cuticular
469 hydrocarbon composition affects heterospecific nestmate recognition in the
470 carpenter ant *Camponotus fellah*. *Chemoecology* 20: 19–24.
- 471 LIEBERT A.E. & STARKS P.T. 2004. The action component of recognition systems: a
472 focus on the response. *Annales Zoologici Fennici* 41: 747-764.
- 473 LIHOREAU M. & RIVAULT C. 2009. Kin recognition via cuticular hydrocarbons shapes
474 cockroach social life. *Behavioral Ecology* 20: 46–53.
- 475 LIZÉ A., CARVAL D., CORTESERO A.M., FOURNET S. & POINSOT D. 2006. Kin
476 discrimination and altruism in the larvae of a solitary insect. *Proceedings of the*
477 *Royal Society of London (Series B, Biological Sciences)* 273: 2381–2386.
- 478 LIZÉ A., CORTESERO, A.M., BAGNÈRES A.G. & POINSOT D. 2010. *I* 21: 633–638.
- 479 MATEO J.M. 2004. Recognition systems and biological organization: the perception
480 component of social recognition. *Annales Zoologici Fennici* 41: 729–745.
- 481 MEHDIABADI N.J., JACK C.N., FARNHAM T.T., PLATT T.G., KALLA S.E., SHAULSKY G.,
482 QUELLER D.C. & STRASSMANN J.E. 2006. Kin preference in a social microbe. *Nature*
483 442: 881–882.
- 484 MEHDIABADI N.J., KRONFORST M.R., QUELLER D.C. & STRASSMANN J.E. 2008.
485 Phylogeny, reproductive isolation and kin recognition in the social amoeba
486 *Dictyostelium purpureum*. *Evolution* 63: 542–548.
- 487 MEHLIS M., BAKKER T.C.M., ENGQVIST L. & FROMMEN J.G. 2010. To eat or not to eat:
488 egg-based assessment of paternity triggers fine-tuned decisions about filial
489 cannibalism. *Proceedings of the Royal Society of London (Series B, Biological*
490 *Sciences)* 277: 2627–2635.

- 491 MICHAUD J.P. 2003. A comparative study of larval cannibalism in three species of
492 ladybird. *Ecological Entomology* 28: 92–101.
- 493 MICHAUD J.P. & GRANT A.K. 2004. Adaptive significance of sibling egg cannibalism in
494 Coccinellidae: comparative evidence from three species. *Annals of the*
495 *Entomological Society of America* 97: 710–719.
- 496 MOORE J. 2007. Perspective: Phenotype matching and inbreeding avoidance in African
497 elephants. *Molecular Ecology* 16: 4421–4423.
- 498 MOURA P.A., QUEK S.P., CARDOSO M.Z. & KRONFORST M.R. 2011. Comparative
499 population genetics of mimetic *Heliconius* butterflies in an endangered habitat;
500 Brazil's Atlantic Forest. *BMC Genetics* 12: 9.
- 501 OSTROWSKI E.A., KATOH M., SHAULSKY G. & QUELLER D.C., STRASSMANN, J.E., 2008.
502 Kin discrimination increases with genetic distance in a social amoeba. *PLoS*
503 *Biology* 6: 2376–2382.
- 504 PATTERSON L., DICK J.T.A. & ELWOOD R.W. 2008. Embryo retrieval and kin recognition
505 in an amphipod (Crustacea). *Animal Behaviour* 76: 717–722.
- 506 PIERCE, N.E. 1995. Predatory and parasitic Lepidoptera: carnivores living on plants.
507 *Journal of the Lepidopterists' Society* 49: 412–453.
- 508 RICHTER P. 1986. Inheritance of cannibalism behaviour in noctuid larvae: a single gene
509 hypothesis. *Biologisches Zentralblatt* 105: 615–619.
- 510 SCHNEIDER J.M. & BILDE T. 2008. Benefits of cooperation with genetic kin in a
511 subsocial spider. *PNAS* 105: 10843–10846.
- 512 SCHWEITZER D.F. 1979. Predatory behavior in *Lithophane querquera* and other spring
513 caterpillars. *Journal of the Lepidopterists' Society* 33: 129–134.
- 514 SHARP S.P., MCGOWAN A., WOOD M.J. & HATCHWELL B.J. 2005. Learned kin
515 recognition cues in a social bird. *Nature* 434: 1127–1130.

- 516 SHERBORNE A.L., THOM M.D., PATERSON S., JURY F., OLLIER W.E.R., STOCKLEY P.,
517 BEYNON R.J. & HURST J.L. 2007. The genetic basis of inbreeding avoidance in
518 house mice. *Current Biology* 17: 2061–2066.
- 519 STUART R.J. & HERBERS J.M. 2000. Nest mate recognition in ants with complex
520 colonies: within- and between-population variation. *Behavioral Ecology* 11: 676–
521 685.
- 522 TELFER W.H. 2009. Egg formation in Lepidoptera. *Journal of Insect Science* 9: 1–21.
- 523 TSUTSUI N.D. 2004. Scents of self: The expression component of self/non-self
524 recognition systems. *Annales Zoologici Fennici* 41: 713–727.
- 525 TSUTSUI N.D., SUAREZ A.V. & GROSBURG R.K. 2003. Genetic diversity, asymmetrical
526 aggression, and recognition in a widespread invasive species. *PNAS* 100: 1078–
527 1083.
- 528 WATANABE M. & OH'URA T. 1997. Egg cannibalism by newly hatched larvae of the small
529 white butterfly, *Pieris rapae crucivora* (Pieridae), on an artificial diet. *Journal of*
530 *the Lepidopterists' Society* 51: 304–315.
- 531 WATANABE M. & YAMAGUCHI H. 1993. Egg cannibalism and egg distribution of two
532 *Pieris* butterflies, *Pieris rapae* and *P. melete* (Lepidoptera, Pieridae) on a host
533 plant, *Rorippa indica* (Cruciferae). *Japanese Journal of Ecology* 43: 181–188.
- 534 WCISLO W.T. 1997. Social interactions and behavioral context in a largely solitary
535 bee, *Lasioglossum* (*Dialictus*) *figueresi* (Hymenoptera,
536 Halictidae). *Insectes Sociaux*. 44: 199–208.
- 537 WILLIAMS K.S. & GILBERT L.E. 1981. Insects as selective agents on plant vegetative
538 morphology: egg mimicry reduces egg laying by butterflies. *Science* 212: 467–469.

539 WILLIAMS T. & HERNÁNDEZ O. 2006. Costs of cannibalism in the presence of an
540 iridovirus pathogen of *Spodoptera frugiperda*. *Ecological Entomology* 31: 106–
541 113.

542 ZAGO-BRAGA R.C. & ZUCOLOTO F.S. 2004. Cannibalism studies on eggs and newly
543 hatched caterpillars in a wild population of *Ascia monuste* (Godart) (Lepidoptera,
544 Pieridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 48: 415–420.

545

546

547 Table 1

548

549 Table 2

550

551 Table 3

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567 Table 1 – Frequency of cannibalism and non-cannibalism of the paternal half-sibling
 568 caterpillar towards the other two eggs (siblings to each other) and expected
 569 frequencies of cannibalism for unrelated and siblings, according to DE NARDIN &
 570 ARAÚJO (2011).

Behavior	Frequency observed(%)	Expected for	
		Unrelated*	Siblings*
Cannibalized	36 (83.7)	83	53
Not cannibalized	7 (16.3)	17	47
Total	43	100	100

* DE NARDIN & ARAÚJO (2011), percentage values for N = 100.

571

572

573 Table 2 – Absolute and relative frequency of cannibalism among 1st instar caterpillars,
574 siblings and unrelated.

Kinship	Cannibalized (%)	Not-cannibalized (%)	N
Siblings	19 (63.3)	11 (36.7)	30
Unrelated	17 (56.7)	13 (43.3)	30

575 Contingency G test (Williams): 0.2709; df = 1; $P = 0.6027$

576

577

578

579 Table 3 – Median (range) of the different behaviours observed in the four experimental
 580 groups. The sixth column (*P*) indicates the probability of the null hypothesis for each
 581 behaviour, tested by Kruskal-Wallis.

Behaviour	Siblings (1st – 3rd instar)	Siblings (2nd – 4th instar)	Unrelated (1st – 3rd instar)	Unrelated (2nd – 4th instar)	<i>P</i>
Indifference	3 (0 – 8)	3 (0 – 10)	4 (1 – 10)	5 (0 – 7)	0.741
Escape	2 (1 – 4)	2 (0 – 5)	2 (0 – 4)	2 (0 – 4)	0.736
Hostility	1 (0 – 4)	2 (0 – 8)	2 (0 – 5)	2 (0 – 10)	0.336
Attack	3 (0 – 8)	4 (0 – 9)	3 (0 – 7)	4 (1 – 8)	0.297
Cannibalism	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0.924

582

583