

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR



**O COMPORTAMENTO DE LARVAS DE *Dryas iulia alcionea*  
(Lepidoptera:Nymphalidae): IMPLICAÇÕES ECOLÓGICO-EVOLUTIVAS**

Aluno: Nicolás Oliveira Mega

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

PORTO ALEGRE, ABRIL DE 2004

Para Meu Pai, minha Mãe e meus  
irmãos, os melhores professores que já tive.

“[...] nunca podemos chegar a conhecer verdadeiramente algo que se transforma. Sobre as coisas do *mundo dos sentidos*, coisas tangíveis, portanto, não podemos ter senão opiniões incertas”.

Platão

(437-347 a.C.)

## **Agradecimentos**

Esta é a segunda vez que escrevo meus agradecimentos após um trabalho escrito e, assim como na primeira, também não acho que tenha sido uma tarefa fácil. O mais complicado de tudo é lembrar de agradecer a todos que merecem. Certamente irei esquecer alguém, mas não se preocupem: guardo todos vocês no meu coração e é isso que importa. Então, aí vai!

Primeiramente, agradeço aos colegas de laboratório, Kris (Tina), Ernesto, Adriano, Marina, Estevan, C.B. e Aldo, pela descontração e pelos momentos de amizade. Acho que ninguém conseguiria terminar um projeto como este, com a sua sanidade mental em perfeito juízo, se não fosse pela quantidade de bobagens e brincadeiras que se fazem entre a leitura de um artigo e outro, ou ainda entre aquele e este experimento. Acho que só agora entendo o valor de se ter amigo de verdade no laboratório ao invés de um apenas um colega. Alguns colegas de Departamento também merecem seus créditos neste sentido.

Não posso deixar de agradecer àqueles que prestaram inestimável ajuda na criação e cuidados das larvas, bem como nos momentos de dúvidas e discussões científicas (Adriano, Aldo, Ernesto e Kris).

A Dana que, mesmo muitas vezes ausente e preocupada com os seus problemas pessoais, sempre me deu forças durante estes dois anos. Acho que ela sabe exatamente o que é passar por esta experiência. Obrigado pelo carinho, atenção e discussões (científicas, é claro). Brincadeiras à parte, a companhia dela nestes quase cinco anos me ajudou muito a crescer, tanto profissionalmente como na vida pessoal. Sei que ela sabe disso, afinal.

Ao apoio incondicional do meu guru, Aldo. Cheguei a ele procurando um rumo, já que outras portas haviam se fechado para mim, e encontrei mais do esperava, encontrei um amigo. Disse anteriormente que o rumo que assumia neste mestrado era, de certa forma, uma semente plantada por ele. Posso dizer, sem sombra de dúvida, que essa semente já germinou e está muito contente onde se encontra. Os frutos ainda estão por amadurecer.

Não posso deixar de mencionar o pessoal do futebol e do basquete, que ajudaram a manter a “forma física” desta dissertação, bem como aos amigos que tentaram liquidar com ela (no bom sentido, é claro). De um jeito ou de outros, eles foram importante para a boa saúde das coisas.

Tenho que agradecer ao suporte financeiro do CNPq, que sustentou parcialmente os gastos deste projeto e todos os gastos deste mestrando (é óbvio!). Sem essa bolsa, financiada a muito custo pelo povo brasileiro, este projeto não teria saído do papel.

Por fim, mas não por último, tenho que agradecer muito ao apoio e amor dos meus pais; se devo realmente a alguém por estar aqui hoje é a eles. As pessoas vão e vem nas nossas vidas, mas nossos irmãos e pais sempre ficam e estão pronto para ajudar no que for preciso. Por isso esta dissertação vai dedicada a vocês, minha família, especialmente ao pai e a mãe. Amo vocês!

## SUMÁRIO:

### 1. INTRODUÇÃO

1.1. Uma visão geral da interação planta-inseto.....	08
1.2. O gênero <i>Passiflora</i> e a tribo Heliconiini.....	11
1.3. O subgênero <i>Decaloba</i> e <i>Dryas iulia</i> : a história de um caso.....	14

### 2. CAPÍTULO 1: Evidences of adaptive behavior in *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera: Nymphalidae) using resting-sites against ant

predation.....	19
Abstract.....	21
Introduction.....	22
Material and Methods.....	24
Results and Discussion.....	26
References.....	30
Tables and Figures.....	33

### 3. CAPÍTULO 2: Ethological analysis of the resting-site build behavior in *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera: Nymphalidae) using decision-trees

and classic description observations.....	38
Abstract.....	40
Introduction.....	41
Material and Methods.....	44
Results and Discussion.....	45
References.....	52
Tables and Figures.....	56

<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>78</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Uma visão geral da interação planta-inseto**

Interações planta-artrópodos foram intensamente investigadas durante as últimas quatro décadas, contribuindo com grandes descobertas no estudo das relações interespecíficas. Estes estudos têm mostrado diversos níveis de associação entre fauna e flora, que vão desde associações facultativas até mutualistas e obrigatórias (Janzen, 1967; Bentley, 1977; Beattie, 1985). Dentre os diversos grupos de artrópodos que exploram plantas, 10 deles utilizam os nectários das plantas (Koptur, 1992). Estes nectários têm função atrativa, podendo estar localizados em diversas partes das plantas, porém se distinguem em dois grupos básicos: os relacionados à polinização e os não-relacionados à polinização e/ou reprodução. No primeiro caso, a função básica da estrutura é atrair polinizadores para as flores, promovendo assim o fluxo gênico entre as partes reprodutivas das plantas, ou ainda atrair dispersores de embriões. No segundo caso, atualmente, existe um consenso de opiniões quanto à função dos nectários extra-florais, afirmando que estas estruturas atuam como atratores de agentes anti-herbívoros, já que eles ocorrem comumente em lâminas foliares, ráquis, pecíolos, caules ou nas proximidades de partes reprodutivas da planta, podendo também ser encontrados em brácteas, estípulas ou cotilédones (Bentley, 1977). De fato, a cerca de 20 anos atrás, existiam duas diferentes correntes de pensamento quanto a função dos nectários extraflorais (NEFs), sendo a bibliografia bastante abundante sobre o tema (Bentley, 1977). A primeira delas alegava que os NEFs seriam estruturas

que funcionariam como glândulas de excreção, exsudando compostos gerados pelo metabolismo secundário da planta, compostos estes que seriam desnecessários ou produzidos em excesso pelo organismo. Neste ponto de vista, os NEFs corresponderiam a uma exaptação e não a uma adaptação. A segunda corrente defendia uma função protetora para os NEFs. Como o néctar liberado era rico em açúcares e aminoácidos, componentes estes de alto valor metabólico e que são comumente produzidos pelas plantas para atuarem na constituição de tecidos em crescimento e em reservas, seria pouco provável que a planta investisse tamanho esforço metabólico na secreção de compostos produzidos em excesso. Uma série de trabalhos mostrou que a solução liberada pelas plantas atraía animais nectaríferos, tais como formigas, vespas e percevejos, proporcionando defesa extra, indireta, contra a herbivoria. Além disso, certas plantas que apresentavam NEFs modificavam a composição da substância secretada em função do ataque de herbívoros, geralmente aumentando a concentração de açúcares e aminoácidos. Tais evidências fez ser aceita a hipótese protetora dos NEFs.

A maioria dos invertebrados que visitam nectários extraflorais são formigas (Koptur, 1992; Freitas & Oliveira, 1996); estas defendem a planta dos demais animais, podendo fazer dela uma extensão do seu próprio território (Hölldobler & Wilson, 1990). Nestes casos os benefícios são mútuos: a planta oferece abrigo e alimento, enquanto as formigas patrulham a hospedeira a fim de inibir o ataque de herbívoros e exploradores oportunistas.

Estudos de campo tem mostrado que a relevância das formigas como agente anti-herbívoro é de fundamental importância para a sobrevivência das plantas com NEFs, tanto em zonas temperadas como tropicais (revisão em

Bentley, 1977; Koptur, 1992). Nestes casos, a dissuasão dos herbívoros resulta de um comportamento predatório/agressivo próximo a fonte de néctar (Hölldobler & Wilson, 1990; Freitas & Oliveira, 1996). Estas ações contra os herbívoros podem ocorrer em diversos níveis. Foram documentados ataques às fêmeas de insetos que estão em processo de ovoposição (Janzen, 1967; Inouye & Taylor, 1979; Schemske, 1980), a ovos já postos na planta hospedeira (Letourneau, 1983) e a larvas (Freitas & Oliveira, 1992, 1996). Ataques a larvas são comuns, havendo registros quanto a lepidópteros (Montllor & Bernays, 1993).

Como resposta evolutiva aos ataques de predadores, as larvas de certas espécies de lepidópteros desenvolveram uma série de estratégias de defesa. Uma vez que as larvas não apresentam muita mobilidade, estas defesas são geralmente passivas. Entre elas podem ser citadas características morfológicas (espinhos, pelos), defesas químicas (impalatabilidade, odores), camuflagem/mimetismo, mirmecofilia (larvas produzem néctar e recebem proteção das formigas em troca) e características comportamentais. Este último aspecto de defesa tem sido intensamente estudado e inclui uma gama interessante de variedades. Entre eles, podemos citar: agregação (Nilson & Forsman, 2003), dobramento e enrolamento foliar (construção de abrigos) (Weiss, 2003), “minação” (Bacher *et. al.* 1996), agitação, curvamento e batimentos (Walters *et. al.*, 2001), regurgitação (Alexander, 1961), barreiras de espuma (DeVries, 1991), suspensão por fios de seda (Alexander, 1961; DeVries, 1987), comportamento de se esconder e de fuga (Aiello, 2003), construção de estruturas de isolamento como “*trampolin de fezes*” (estruturas formadas por mistura de fezes e seda, assemelhando-se a pequenos pedaços

de ramos da folhagem, secos e sobre os quais as larvas se posicionam quando em repouso) (DeVries, 1987; Freitas e Oliveira, 1992), veias foliares (Freitas, 1999a; Machado & Freitas, 2001) e refúgios tipo ilha (*resting-sites*) em segmentos e veias foliares (Penz, 1999).

A construção de estruturas de isolamento parece prover um eficiente abrigo contra artrópodos cursoriais predadores, pois isola a larva da lâmina foliar quando ela não está se alimentando (Freitas & Oliveira, 1996). Este comportamento é comum nos primeiros ínstaras larvais, sendo uma característica amplamente distribuída entre os ninfalídeos, principalmente nas subfamílias Biblidinae, Charaxinae, Limenitidinae e na tribo Coloburini (Casagrande & Mielke, 1985; DeVries, 1987; Aiello, 1991; Freitas & Oliveira, 1992). Apesar disto, Freitas & Oliveira (1996) sugerem que os trampolins de fezes não precisariam ter evoluído necessariamente como uma resposta à predação em plantas visitadas por formigas, mesmo que o comportamento de repouso nessas estruturas diminua a taxa de predação das larvas ou a remoção delas por formigas.

## **1.2. O gênero *Passiflora* e a tribo Heliconiini**

As plantas do gênero *Passiflora* fazem parte de um grupo de organismos popularmente conhecidos como maracujás e atualmente sistematizadas dentro da família Passifloraceae (Mega, 2002). O número de representantes deste grupo é elevado, existindo diversos subgêneros, cada um deles divididos em várias seções. Vecchia (2001) reconhece 24 subgêneros, sendo o mais diverso o subgênero *Passiflora*.

Uma característica marcante do grupo é a flor, que apresenta estruturas coloridas e muito peculiares. Além das flores, as passifloráceas se destacam por possuírem estruturas vegetativas que possivelmente surgiram como resposta à predação e interação com certas famílias de insetos (Benson *et al*, 1975). Um aspecto de grande relevância para esta história evolutiva possivelmente tenha sido o surgimento dos nectários extraflorais. Estas estruturas produzem grande quantidade de néctar que poderiam chamar a atenção de artrópodos coletores ao mesmo tempo em que proporcionariam uma defesa extra contra herbívoros (Bentley, 1977).

A família Passifloraceae tem distribuição basicamente neotropical, fazendo-se presente também em algumas áreas da África e Ásia (Killip, 1938; Cervi, 1997). Dentre as espécies que ocorrem no Neotrópico, podemos destacar algumas que são de ocorrência natural no Rio Grande do Sul: *Passiflora actinia*, *P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. eichleriana*, *P. edulis*, *P. elegans*, *P. foetida*, *P. misera*, *P. morifolia*, *P. organensis*, *P. suberosa*, *P. tricuspis* e *P. tenuifila* (Mondin, 2001). Muitas delas apresentam grandes áreas de distribuição, sendo amplamente utilizadas por borboletas da tribo Heliconiini. Assim, elas constituem um grupo que mantém estrita relação com as Passifloraceae.

Benson *et al.* (1975) sugerem que a especificidade de um inseto herbívoro por uma planta não se deve somente a grande capacidade de localizar e identificar a hospedeira, mas também devido a um “instinto botânico”: insetos proximamente relacionados escolhem plantas proximamente relacionadas. Ehrlich & Raven (1964) já haviam desenvolvido esta teoria, baseando-se em dados observados para borboletas e suas hospedeiras. O

modelo envolvia radiação adaptativa por linhagem de plantas que evoluíram meios de intimidação contra herbívoros; em resposta, as linhagens de borboletas teriam sofrido radiações adaptativas, evoluindo métodos bem sucedidos para evitar estas defesas. Assim, correlações de alto nível taxonômico entre insetos e suas plantas hospedeiras seriam devido à evolução concomitante entre os dois grupos (coevolução).

As borboletas heliconineas (da subfamília Heliconiinae à qual pertence *Dryas iulia*) são usualmente consideradas impalatáveis para predadores vertebrados (DeVries, 1987). Elas adotaram colorações exageradas nas asas e padrões de comportamentos conspícuos para anunciar esta propriedade. De modo geral, a cladística dos Heliconiini (tribo) é bem conhecida. Em um trabalho recente, Penz (1999) propôs uma hipótese filogenética para estas borboletas, baseada em caracteres morfológicos de estágios imaturos e adultos. Utilizando 10 gêneros diferentes (*Agraulis*, *Dione*, *Podotricha*, *Dryadula*, *Dryas*, *Philaethria*, *Laparus*, *Neruda*, *Eueides* e *Heliconius*), Penz concluiu que a filogenia obtida suporta a monofilia do grupo. As formas mais ancestrais seriam os gêneros *Dione* e *Agraulis*, enquanto que as espécies mais derivadas seriam pertencentes ao gênero *Heliconius*, como comentado por Alexander (1961).

Curiosamente, os dados de Penz (1999) concordam com os dados obtidos por Benson *et al.* (1975), que indicam que as espécies de Heliconiini mais ancestrais estão fortemente relacionadas aos gêneros mais antigos de Passifloraceae. Dentro do gênero *Passiflora*, o mesmo tipo de relação também é observada: espécies de borboletas mais ancestrais estão relacionadas a subgêneros supostamente também mais basais.

### 1.3. O subgênero *Decaloba* e *Dryas iulia*: a história de um caso

O subgênero *Decaloba* (antigo *Plectostemma*) (gênero *Passiflora*) tem como característica principal a ausência de pétalas em suas diminutas flores. Entre as espécies do subgênero que ocorrem no Rio Grande do Sul, temos: *Passiflora capsularis*, *P. misera*, *P. morifolia*, *P. organensis*, *P. suberosa* e *P. tricuspis*.

*Dryas iulia* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera, Nymphalidae) é uma espécie de borboleta que se distribui do sul dos Estado Unidos ao norte do Uruguai e Argentina (Emsley, 1963, DeVries, 1987). Emsley (1963) reconhece doze subespécies, as quais se diferenciam em algumas características, tais como coloração de fundo, intensidade e extensão das manchas negras e presenças de androcônias nas asas (escamas glandulares especiais, possuídas somente pelos machos, que possuem função de estimulação sexual das fêmeas). Segundo Brown (1979, 1992) as populações continentais sul-americanas são predominantemente de *Dryas iulia alcionea* (Cramer, 1779). As formas adultas apresentam coloração laranja, possuindo algumas barras pretas nas asas. Os machos geralmente apresentam tons mais vibrantes, possuindo as barras pretas de menor espessura em relação às fêmeas. Os machos costumam voar mais alto, mais rápido e de forma mais linear do que as fêmeas, já que estas estão a maior parte do tempo à procura de plantas hospedeiras para a oviposição.

Esta espécie é encontrada em diversos habitats, estando geralmente associada a locais perturbados (Paim *et al.*, 2004). Nestes locais, a presença de passifloras é bastante constante. Apesar de usar várias passifloras como

hospedeiras, *D. iulia* está fortemente associada ao subgênero *Decaloba* (Brown & Mielke, 1972; Benson et al. 1975; Périco & Araújo, 1991).

Ao longo de toda a sua distribuição, sua área de ocorrência é sobreposta com a das suas hospedeiras. Dependendo da localidade, *D. iulia* oviposita preferencialmente em uma espécie ou outra. No hemisfério norte (Texas, EUA), ela usa preferencialmente *Passiflora lutea*, *P. vitifolia*, *P. platyloba* e *P. suberosa*; no hemisfério sul (Brasil, Região Sul), ela usa *P. capsularis*, *P. suberosa* e *P. misera* como hospedeira para suas larvas. Périco & Araújo (1991) estudaram processos de escolha para a ovoposição de fêmeas de *D. iulia* tendo encontrado dados interessantes. Em testes de escolha simples, onde a borboleta não tinha oportunidade de escolha, as preferências foram: *P. suberosa*, *P. misera* e *P. capsularis*, respectivamente. Já para testes de escolha múltipla, onde as fêmeas podiam escolher entre plantas de diferentes espécies, foi encontrado a seguinte ordem de preferência: *P. capsularis*, *P. suberosa* e *P. misera*. A oviposição não precisa ocorrer necessariamente na planta hospedeira (pode ocorrer também em outras plantas que se encontrem ao redor).

Quando os ovos são postos em *P. suberosa*, assim como em outras espécies do subgênero *Decaloba*, geralmente se localizam em gavinhas, estruturas ressecadas, folhas velhas ou em refúgios abandonados (Groehs, 2000). Estas evidências empíricas sugerem que a fêmea apresente algum mecanismo de reconhecimento de estruturas que possa maximizar as chances de sobrevivência de seus descendentes.

Alexander (1961), descreve que o comportamento “channeling” e “bridging” é apresentado por larvas de *Dryas iulia* de 1º a 5º estágio. Segundo o

autor, estes comportamentos de consumo da área foliar da planta hospedeira estão envolvidos na construção das estruturas aqui chamadas de refúgios. Entretanto, estudos mais detalhados indicam evidências um pouco distintas, apontando que os refúgios citados anteriormente são construídos pelas larvas de 1º a 3º estágio. (Groehs, 2000). Este mesmo autor mostrou que a maioria das larvas permanece em refúgios até o 3º estágio, mas os motivos desta permanência ainda não estão bem esclarecidos. Acredita-se que o desenvolvimento de um tamanho corporal relativamente grande impossibilite a permanência das larvas em seu refúgio, bem como impressione eventuais predadores (a exemplo do que ocorre com *Eunica bechina*; Freitas e Oliveira, 1996). Associado a este efeito, a maturidade de estruturas morfológicas de defesa impede a aproximação de predadores às áreas vitais do corpo da larva. Este conjunto de fatores maximizaria a sobrevivência das larvas até o estágio de pupa. Freitas e Oliveira (1996) também sugerem que, além do tamanho da larva, a pressão exercida pela visita de formigas também é crucial para a sobrevivência.

Groehs (2000) realizou outros experimentos e encontrou resultados interessantes. Entre eles, o experimento que procurava apontar até que estágio as larvas de *Dryas iulia* permanecem em seu refúgio, constatou que 100% das larvas observadas (n=25) permaneceram em seu refúgio até o terceiro estágio. Já no quarto estágio somente 48% das larvas ainda utilizavam frequentemente o refúgio, enquanto no quinto estágio nenhuma larva foi observada nestas estruturas. Após abandonarem os refúgios, as larvas se encontravam nas folhas, caules e até fora da planta hospedeira.

Não se sabe se este comportamento de permanência nos refúgios é semelhante em condições naturais. Contudo, experimentos realizados por nosso grupo (R. Groehs, 2000 e N. Mega, dados não publicados) apontam que larvas de primeiros estádios apresentam tendência a reconstruir seus refúgios quando estes são removidos. Além do mais, larvas de *D. iulia* apresentam taxa maior de sobrevivência até estágio de pupa quando as plantas hospedeiras são submetidas a tratamentos com exclusão de formigas (60% contra 26,7%,  $p < 0,05$ ). Apesar das evidências de que a presença de formigas sobre os ramos de *P. suberosa* possui forte influência na sobrevivência das larvas, estes resultados não são totalmente conclusivos: eles servem com evidência empírica que o comportamento de construção e utilização dos refúgios seja importante para as larvas jovens.

Em termos descritivos, o comportamento de algumas larvas observadas obedece a um padrão praticamente constante. Inicialmente, a larva recém eclodida do ovo sai do local da oviposição e busca as folhas da planta hospedeira (sempre *Passiflora*, geralmente *P. suberosa*). Uma vez na folha, inicia o trabalho de construção dos refúgios. Este processo é intercalado por momentos de pausa e herbivoria, sendo que após a construção a larva permanece nele até que necessite se alimentar. Enquanto está no refúgio, a larva fica imóvel ou mantém um estado de “gancho” ou de “J” (Alexander, 1961). Este estado é típico de algumas borboletas, onde a larva fica com metade do corpo na folha e metade no ar. Já durante o forrageamento a larva não se afasta muito do refúgio, retornando para ele sempre que possível. Muitas vezes, ao invés de retornar ao refúgio, a larva permanece imóvel ou se joga da folha. Neste último caso, ela fica presa à folha por um fio de seda,

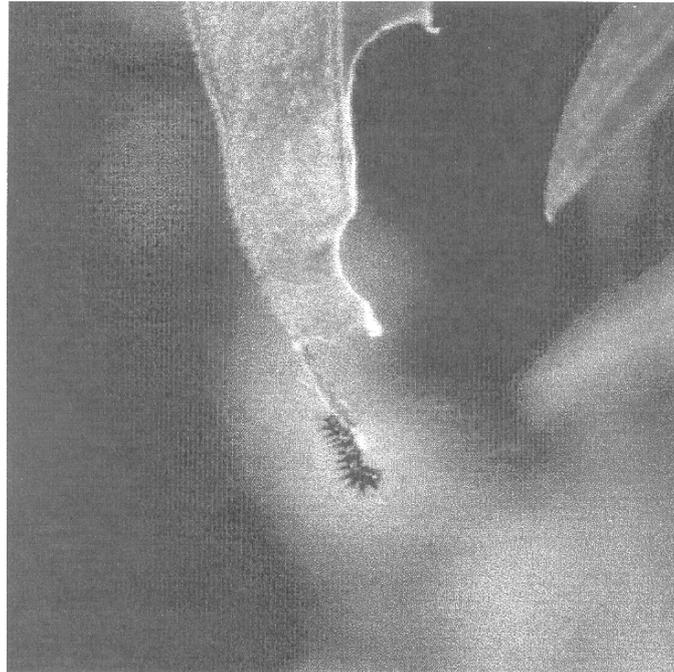
retornando ao limbo foliar logo que o perigo se afasta. Em raros casos as larvas saem da folha onde estavam originalmente, migrando para outra folha vizinha. Se este comportamento ocorre, neste novo local ela constrói outro refúgio, abandonando a primeira folha que lhe serviu de moradia e alimento.

Segundo Smiley (1985) o período em que a mortalidade de larvas dos insetos é maior é justamente quando as larvas estão se estabelecendo, sendo o tamanho/estádio menos importante do que o próprio evento de estabelecimento. Considerando a complexidade do comportamento descrito, certamente este período é crítico também para as larvas de *D. iulia*. Seria possível supor vários motivos para esta dinâmica. Entre eles, temos o fato de que freqüentemente ovos são postos longe das folhas (em gavinhas ou plantas vizinhas) (N. Mega, dados não publicados). Assim, após a eclosão do ovo, o deslocamento das larvas traria um grande risco de predação. A chance de encontrar uma formiga neste deslocamento inicial varia com o nível de visitação de formigas, mas provavelmente é o momento em que há a maior chance de um contato entre larva e predador. Se a larva conseguir chegar até a folha, ela ainda terá que evitar o contato com formigas até que seu refúgio esteja construído. Este é um segundo momento de vulnerabilidade da larva. Após a construção do refúgio, a larva ainda ficará exposta a ataques enquanto forrageia. Para isso, ela deverá abandonar a estrutura que construiu e invadir zonas do limbo onde a presença de predadores é constante: eis outro ponto de mortalidade alta.

Tendo em vista os problemas expostos em relação a ação de predadores nos estádios larvais iniciais de *Dryas iulia alcionea*, o presente trabalho se propõem a responder algumas questões referentes ao

comportamento de construção de refúgios apresentado por essa espécie. Assim, este trabalho se divide em dois trabalhos completos, escritos sob forma de artigos. O primeiro artigo explora um conjunto de evidências diretas e indiretas para avaliar se a construção de refúgios pelas larvas de *Dryas iulia alcionea*, em plantas de *Passiflora suberosa*, pode ser considerada um comportamento adaptativo evoluído em função da pressão de predação exercida por formigas. O segundo artigo analisa eventos etológicos associados à construção de refúgios. Neste trabalho, são focadas as diferenças comportamentais entre estágios larvais e a importância para a sobrevivência larval e desenvolvimento a cada etapa. Nós também especulamos sobre a significância evolutiva do comportamento em questão associado com o comportamento de oviposição apresentado pelas fêmeas de *D. iulia* na tentativa de maximizar a sobrevivência de neonatos. Na tentativa de expor os pontos de maior mortalidade e a ação de predadores nessas taxas, tabelas de vida foram elaboradas para estágios pré-adulto e comparadas entre os diferentes níveis de desenvolvimento. Por fim, apresentamos uma discussão final, englobando os dados apresentados nos dois artigos e informações obtidas da bibliografia consultada.

## CAPÍTULO 1



Evidence of adaptive behaviour in *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera: Nymphalidae) using resting-sites against ant predation.

Artigo a ser submetido para a revista *Ecological Entomology*

**Does caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae) show evidences of adaptive behaviour to avoid ant predation?**

Nicolás Oliveira Mega and Aldo Mellender de Araújo

Running title: anti-predator behaviour in *Dryas iulia alcionea* caterpillars.

Keywords: caterpillar resting-site, Heliconiinae, anti-predator adaptation.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, C. Postal 15053; 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Aldo M. de Araújo, [aldomel@portoweb.com.br](mailto:aldomel@portoweb.com.br)

## **Abstract:**

Plants bearing extrafloral nectaries can attract wasps, bugs, and mainly ants. They can defend the plant against herbivores, treating the plant as an extension of their own territory. Here we evaluate the efficiency of resting-sites built by *Dryas iulia alcionea* larvae, against ant predation in the host *Passiflora suberosa*. Sixty eggs were transferred individually to isolated branches of *P. suberosa* and their development was followed until the emergence of the adults. Two treatments were applied: (1) allowing for the presence of ants and (2) with the exclusion of ants. The results showed that ants in *P. suberosa* have significant influence in the survival of larvae of *D. iulia*. The use/building of resting-sites was recorded to fourth instar. We found a strong inverse relationship between the number of resting-sites built per larvae and development of instars; fifth instar larvae could be better protected by their size or by being more aggressive towards intruders. In nature, over 300 immatures were observed during ten minutes after the removal of the resting-site. A large fraction of first / second instars rebuilt the structure, decreasing in the third instar becoming a minority in the fourth (null in the fifth instar). These results suggest that the utility of the resting-sites against cursorial predators decreases with development. The behaviour of building resting-sites probably evolved by natural selection. It is likely that this behaviour was important for the ancestral lineage that gave origin to Heliconiinae genera *Dryas*, *Dryadula* and *Phylaetria*.

## **Introduction**

As an evolutionary response to the attacks of predators, larvae of some lepidoptera species developed an array of defence strategies (Evans &

Schmidt, 1990; Montllor & Bernays, 1993; Zalucki *et. al.* 2002). Since caterpillars do not have much mobility, these defences are generally passive, as morphological traits (scoli, spines, hairs), chemical defence (unpalatability, odours), camouflage/mimicry, myrmecophily and behavioural traits, as foam barriers, scape holes, bending and beating, mining, regurgitating, suspension by silken threads, grouping, leaf folding and rolling, frass-chains and resting-sites (Aiello, 1991; DeVries, 1987; Aiello, 1991; DeVries, 1993; Bacher *et. al.*, 1996; Dryer, 1997; Freitas & Brown, 2004; Penz, 1999; Machado & Freitas, 2001; Walters *et. al.*, 2001; Aiello & Solis, 2003; Nilson & Forsman, 2003; Weiss, 2003).

The construction of resting-sites seems to provide an efficient protection against cursorial predators, especially ants, isolating the caterpillar from the leaf blade when not foraging (Freitas & Oliveira, 1996). This behaviour is common in early larval instars of many species, mainly in the family Nymphalidae (Alexander, 1961; DeVries, 1987; Penz, 1999).

*Dryas iulia* Fabricius (1775) is a non-myrmecophilous Neotropical nymphalid butterfly, which occurs almost everywhere in South and Central America up to southern USA. According to Brown & Yepes (1984) and Brown (1992), the continental populations of South America predominantly correspond to *Dryas iulia alcionea* Cramer (1779). Females use *Passiflora* species to lay their eggs, especially plants of the subgenus *Decaloba* (formerly *Plectostemma* – Benson *et al.* 1975). *Passiflora suberosa* Linnaeus (1753), a species with broad distribution and abundance in southern Brazil, particularly in the area here studied, is commonly used by *D.i. alcionea*. It has two distinct sets of

extrafloral nectaries (EFNs), one pair in the petiole and other, in variable number, at the margin of the leaf blade (Guimarães, 2002).

In nature, individuals of *P. suberosa* are frequently visited by ants attracted by EFNs; depending of the ant species an attack to butterfly caterpillars can occur (at least three butterfly species can oviposit on *P. suberosa* in southern Brazil: *Heliconius erato phyllis*, *D. i. alcionea*, and *Agraulis vanillae maculosa*, all belonging to the nymphalid subfamily Heliconiinae).

When starting to feed, larvae of *D.i. alcionea* cut partially a portion of the leaf blade which is kept attached to it and later desiccates; it is then used as a resting-site. When moving over the leaf and encountering with a potential threat, the larva moves back to the resting-site.

In the present study we investigate, both in field and under insectary conditions, if the function of this behaviour (construction and utilization of a resting-site) could be viewed as an adaptation to increase caterpillar survival against ant predation. To our knowledge this is the first report dealing with a species of the subfamily Heliconiinae (Nymphalidae), a group of butterflies of great evolutionary interest due to their spectacular instances of mimicry and speciation (see Joron et al. 2006; Kronforst et al. 2006; Mavárez et al. 2006 for some recent reports on the genus *Heliconius*).

## **Material and Methods**

Field observations were carried out from November/2002 to April/2003 and December/2003 to April/2004, in a secondary semi-deciduous forest in the outskirts of Porto Alegre, capital of the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil (30°04'31" S; 51°07'00" W). There, a high density of *P. suberosa* was

observed, and the presence of ants was abundant over the vegetation. Females caught in nature were brought to an open air insectary to lay eggs for the experiments.

To test if the presence of ants affects the survival of *D. i. alcionea* caterpillars, eggs were transferred to isolated branches of *P. suberosa* (one egg for each branch); a total of 60 branches of about the same size were kept in plastic bottles filled with water, inside the insectary, to follow larval development until fifth instar. Half of those branches were submitted to ant exclusion, by the use of plastic plates below the bottles, filled with water and soap; the other half received no special treatment (control), the bottles being put directly on the ground (being an open air insectary it allowed for the presence of ants as in nature).

A step further was to follow until what instar larvae built and used a resting-site; our investigation consisted in testing the effect of caterpillar size, given the predatory behaviour of the ants. Observations were made both in insectary and in nature. Caterpillars from first to fifth instar were simply observed in their daily activities which involved the building of a resting-site. In insectary, 25 first instar larvae were followed until fifth instar, with the same procedure as that used to exclude ants. In nature, branches of *P. suberosa* with first instar larvae were marked and the observations done almost every day until fifth instar. A total of 393 larvae were observed.

To complement these observations, eggs collected in nature were brought to the laboratory and put individually in plastic pots. The caterpillars were fed daily, with new leaves attached to the pot wall by their petioles. The

number of days to complete larval development as well as the number of resting-sites built were recorded and compared.

Finally, to obtain information about the vulnerability of *D.i. alcionea* larvae in situations where they are away from the resting-site, first to fourth instar larvae (N = 367), were located in host plants in nature and then gently removed from the resting-sites for a few seconds (fifth instar larvae rarely built resting-sites, so they were not included in the experiment). Resting-sites were cut and larvae put back in the same leaves. In the sequence, they were observed for 10 minutes to see their behaviour in the unprotected situation; after one hour we returned to the same plants and recorded the presence or disappearance of the larvae.

## Results and Discussion

Table 1 shows the results obtained for the effects of the exclusion of ants on larval survivorship in branches of *P. suberosa*. As can be seen, more than 76 % of the caterpillars in the treatment without exclusion of predators have disappeared. Although we were not able to document eventual attacks by ants, this probably happened (both treatments did run day and night, for about a month). Other potential predators like wasps were not allowed to get in the insectary; small Salticidae spiders, however, could be responsible for at least a part of disappearances. This figure contrasts with the 37 % of missing caterpillars in the exclusion treatment. (comparison between treatments:  $\chi^2_{(Yates)} = 11,635$  d.f. = 1;  $P < 0,001$ ). These results show that the presence of cursorial predators in the branches of *P. suberosa* could have a strong influence in the survival of immatures of *D. i. alcionea*. Moreover, they agree with those of

Smiley (1986), which showed that ants caused high mortality of *Heliconius ismenius* caterpillars feeding on *Passiflora* plants. The fact that ants could be responsible for removing immatures of other Heliconiinae species was suggested by Young (1978) and Romanowsky et al. (1985). These authors studied the disappearances of eggs and first/second instar larvae of *Heliconius* spp. in natural conditions. Both studies found 70 – 80 % of losses for immatures of *H. hecale* and *H. cydno* from Costa Rica and *H. erato phyllis* from Southern Brazil. Guimarães (2002), studying EFNs of *P. suberosa* and the ant fauna associated, found that there is a strong positive relationship between the number of EFNs, as well the volume of nectar produced, and the frequency of ants in plant branches. The review by Kessler & Baldwin (2002), include several works that shows the same evidence. So, our experiment as well as others reported in the literature show that ants constitute a strong source of mortality for lepidopteran larvae, as well as for *Dryas iulia alcionea* (probably enhanced by the action of spiders and parasitoids). As for the plant, the empirical evidence showed here gives support to the protective hypothesis for those plants bearing EFNs (Bentley, 1977) and, in this case, it is possible to imagine that plants which produces more nectar though the ENFs increases their adaptive value, by indirect deterrence of herbivore caterpillars. Additional protective effects could be obtained from ant species which are not directly attracted by a source of nectar, but instead, are simply wandering in the plant in search of prey, as in the case of *Vochysia elliptica*, which only produces nectar from its flowers (Romero, 2002).

Figure 1 shows the relative frequencies of use/building of resting-sites for both nature and insectary (discriminated for larval instar); the curves are

very similar indeed, with a high frequency of resting-site construction from first to third instar (1.00 for caterpillars in insectary, free of ants, and 0.98 – 0.80 for those in the field, subjected to all risks of predation). The frequency of this behaviour declines sharply in the fourth instar to null frequency in the fifth instar. At least two reasons could be advanced to explain the suppression of this behaviour at the fifth instar: the first could be simply mechanic, since caterpillars at this instar are large and heavy, being difficult to be sustained in a resting-site without breaking the structure. The second reason is still related to caterpillar size, since it is presumably much more difficult for a predator (an ant, supposedly), to deal with a big prey. Usually, the size of the ants visiting *P. suberosa* in the area studied range in size from 0.5 to 1.5 cm while fifth instar *D. iulia* caterpillars have a mean of 3.5 cm (the difference in volume is much greater). Similar results has been recorded for other three species of Brazilian butterflies: *Eunica bechina* (Freitas and Oliveira, 1996), *Libytheana carinenta* (whose caterpillars, however, build a resting-site even at fifty instar - Freitas, 1999), and *Smyrna blomfieldia* (Machado and Freitas, 2001). These results altogether support the assumption that there are genetic and ecologic factors operating on the resting-site building behaviour. Since it is expected that older and bigger caterpillars represent more difficult prey to catch for some predators, the interaction between larval genome and environment could lead to changes in the behavioural repertoire shown here. On the other hand, it is feasible to admit that natural selection has played a major role on this behaviour; a first instar caterpillar (or older) that do not build a resting-site is at strong risk to be preyed upon. Fifth instar caterpillars, being bigger could use other defence systems, as aggressive behaviour and/or other more complex set of actions (it

should be noted that *D. i. alcionea* caterpillars change their chaetotaxy and external morphology only at the first moult; Paim et al. 2004).

Table 2 shows the mean instar length (days), mean number of resting-site constructions and mean daily rate resting-site constructions of *D. i. alcionea* larvae, after the removal of the structure. As for the mean number of days elapsed for each instar to complete its development, a total of 427 eggs were collected in the field and were brought to the laboratory where they were reared individually at 25° C. As expected, the number of days increase from the first to fifth instar (overall ANOVA,  $F = 82.75$ ;  $p = 0.0002$ ; *a posteriori* tests showed that the statistical significance is due to the fifth instar, which is longer).

To estimate the mean number of resting-site constructions per instar, we started with 42 caterpillars, grown individually in plastic boxes and once a caterpillar had made a resting site it was removed to follow its future behaviour. As can be seen, there is decrease in the mean number of resting-sites from first to fifth instar. In fact, the estimated linear regression equation was  $\log Y = 1.59 - 0.466X$  ( $p < 0.001$ ), where  $X$  is the instar sequence and  $Y$  the number of resting-sites. When the mean number of resting-sites is compared by an analysis of variance, it is shown by *a posteriori* tests that only fourth and fifth instars are not significantly different. (overall ANOVA,  $F = 320.02$  ;  $p < 0.0001$ ). This behaviour seems to indicate an innate decreasing tendency to build the resting structure, which correlates negatively with the caterpillar size (although we did not estimate the correlation), and it is also associated with the findings shown in Figure 1.

The relationship between the length of the instar and the number of resting-sites built in this period revealed that the daily rate construction of

resting-sites was higher in the early instars (Table 2). Since larvae of first and second instar promptly starts to built new resting-sites when they reach a new host plant leaf (personal observations), it seems that the construction of resting-site is very important for early instars larvae.

Caterpillar behaviour after removal of the resting site is shown in Fig. 2. This experiment was done in natural conditions with a total of 382 individuals, each in a different branch of the host-plant (180, 114, 47, 26 and 15 individuals, respectively for first to fifth instars). Figure 2 also shows the frequency of individuals that do not responded in the expected way to the removal of resting-sites, that is, they do not reconstructed another one. The curves shown are complementary and it seems that the turning point is reached by the third instar. A fraction of the individuals for each instar have been lost from the observed branches of *Passiflora suberosa*, when a new round of observations was started.

The data presented here support the hypothesis that resting-sites (*refuges*) increase the survival of first to third / fourth instars of *D.i.alcionea* in *P. suberosa* plants. This behaviour could be a way for the immature to become isolated from the leaf surface, avoiding undesired encounters with ants (or other eventual walking predators). Incidentally, ants were never observed on the refuges. The fact that the frequency of construction of these resting-sites decreases with the age (and size) of the caterpillar could be viewed as a diminished risk of predation as the size of the caterpillar increases, or other defence systems appear. Freitas and Oliveira (1996), however, argue that the analogous behaviour found in *Eunica bechina*, the construction of *frass chains*, despite to increase larval survival against ant predation, might not have evolved

as a specific response to predation risk on ant-visited host plants, since they occur widely in Nymphalidae (Benson et al., 1975, DeVries, 1987; Freitas, 1999) and other families, like Pieridae (genus *Dismorphia*) (Brown, 1992). In fact, it is not known if this widespread behaviour had evolved by natural selection different times in the course of evolution. When we analyse these different groups of Lepidoptera, it is possible to identify different variants of the trait (for instance, the use of starch, silk, frass and leaf veins) which suggest different evolutionary histories for this behavioural trait. We agree with Freitas (1999), when he says that, “all these behaviours represent different ways to maintain themselves isolated from the leaf blade; their occurrence in several different lineages of Lepidoptera show that the fixation of this trait in many cases could be explained by predation pressure”. Based on the data presented here we suggest that the behaviour of building a resting-site has a protective function in *Dryas iulia alcionea*, having evolved by natural selection. The actual effectiveness of this adaptation is, of course, dependent on other factors, as the season of the year as well as random elements in spatial variation, as shown by Barton (1984).

Since *Dryadula* and *Philaethria*, together with *Dryas*, have the same behavioural pattern (Alexander, 1961; Penz, 1999), it is probable that this behaviour was important for the ancestral lineage that gave origin to them.

## References

- Aiello, A. 1991. *Adelpha iulia leucas* immature stages and position within *Adelpha* (Nymphalidae). **Journal of the Lepidopterists Society**, 45: 181-187.
- Aiello, A. & Solis, M. A. 2003. Defense mechanisms in Pyralidae and Choreutidae: Fecal stalactites and escape holes, with remarks about

- cocoons, camouflage and aposematism. **Journal of the Lepidopterists' Society**, 57: 168-175.
- Alexander, A.J. 1961. A study of the biology of the caterpillars, pupae and emerging butterflies of the subfamily Heliconiinae in Trinidad, West Indies. Part I. Some aspects of larval behaviour. **Zoologica**, 46: 1-24.
- Bacher, S., Casas, J. and Dorn, S. 1996: Parasitoid vibrations as potential releasing stimulus of evasive behaviour in a leafminer. **Physiological Entomology**, 21: 33-43.
- Barton, A. M. 1984. Spatial variation in the effect of ants on an extrafloral nectary plant. **Ecology**, 67(2): 495 – 504.
- Benson, W.W.; Brown Jr, S.; Gilbert, L.E. 1975. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, 29: 659-680.
- Bentley, B.L. 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 8: 407-427.
- Brown, K.S. 1992. Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal. p. 142-187. *In*: Morellato, L.P.C. (Ed.). **História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. Unicamp/Fapesp, Campinas. 322 p.
- Brown, K.S. & Yepes, F.F. 1984. Los Heliconinii (Lepidoptera, Nymphalidae) de Venezuela. **Boletín Entomológico de Venezuela. N.S.**, 3: 29-76.
- DeVries, P.J. 1987. **The Butterflies of Costa Rica and their Natural History**. Vol. 1. Princeton University press, New Jersey. 327 pp.
- DeVries, P.J. 1993. Foam barriers, a new defense against ants by milkweed butterfly caterpillars. **Journal of Research on the Lepidoptera**, 30: 261-266.
- Dyer, LA. 1997. Effectiveness of caterpillar defenses against three species of invertebrate predators. **Journal of Research on the Lepidoptera**, 35: 1-16.
- Evans, D.L. & Schmidt, J.O. (Eds). 1990. **Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predator**. University Press, New York.
- Freitas, A.V.L. & Brown, K.S. 2004. Phylogeny of the Nymphalidae (Lepidoptera). **Systematic Biology**, 53(3):363–383.
- Freitas, A.V.L. & Oliveira, P.S. 1992. Biology and behavior of the neotropical butterfly *Eunica bechina* (Nymphalidae) with special reference to larval defense against ant predation. **Journal of Research on the Lepidoptera**, 31: 1-11

- Freitas, A.V.L. & Oliveira, P.S. 1996. Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. **Journal of Animal Ecology**, 65: 205-210.
- Freitas, A.V.L. 1999. An anti-predator behavior in larvae of *Libytheana carinenta* (Nymphalidae, Libytheinae). **Journal of Lepidopterist's Society**, 53(3): 130-131.
- Guimarães, A.A. 2002. **Influencia da variação numérica dos nectários extraflorais de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae) na fauna de formicídeos associada**. Msc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Joron, M.; Jiggins, C.D.; Papanicolaou, A.; McMillan, W.O. 2006. *Heliconius* wing patterns: an evo-devo model for understanding phenotype diversity. **Heredity**, 97: 157-167.
- Kessler, A. & Baldwin, I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, 53: 299-328.
- Kronforst, M.R.; Young, L.G.; Kapan, D.D.; McNeely, C.; O'Neill, R.J.; Gilbert, L.E. 2006. Linkage of butterfly mate preference and wing color preference cue at the genomic location *wingless*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 103 (17) 6575-6580.
- Machado, G. & Freitas, A.V.L. 2001. Larval defense against predation in the butterfly *Smyrna blomfieldia*. **Ecological Entomology**, 26: 436-439.
- Mavárez, J.; Salazar, C.A.; Bermingham, E.; Salcedo, C.; Jiggins, C.D. 2006. Speciation by hybridization in *Heliconius* butterflies. **Nature**, 441: 868-871.
- Montllor, C.B. & Bernays, E.A. 1993. Invertebrate Predators and the Caterpillar Foraging. In: Nancy E. Stamp & Timothy M. Casey (Eds). 1993. **Caterpillars Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging**. Kluwer Academic Publishers, Boston. 548 pp.
- Nilsson, M. & Forsman, A. 2003. Evolution of conspicuous colouration, body size and gregariousness: a comparative analysis of lepidopteran larvae **Evolutionary Ecology**, 17: 51-66.
- Pemberton, R.W. & Vandenburg, N.J. 1993. Extrafloral nectar feeding by ladybird beetles (Coleoptera; Coccinellidae). **Proceedings of Entomological Society of Washington**, 95: 139-151.
- Paim, A.C., Kaminsky L.A., Moreira, G.R.P. 2004. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: IV. *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Iheringia (Série Zoológica)**, 94(1): 25-35.

- Penz, C.M. 1999. Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 127: 277-344.
- Romanowsky, H.P.; Gus, R. & Araújo, A.M. 1985. Studies on the genetics and ecology of *Heliconius erato* (Lepid.; Nymph.). III. Population size, preadult mortality, adult resources and polymorphism in natural populations. **Revista Brasileira de Biologia**, 45(4): 563-569.
- Romero, G.Q. 2002. Protection of *Vochysia elliptica* (Vochysiaceae) by a nectar-thieving ant. **Brazilian Journal of Biology**, 62: 371-373.
- Smiley, J. 1986. Ant constancy at *Passiflora* extrafloral nectaries: effects on caterpillar survival. **Ecology**, 67: 516–521.
- Stamp, N.E. & Casey, T.M. 1993. **Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging**. Chapman & Hall.
- Walters, E.; Illich, P; Weeks, J & Lewin, M. 2001. Defensive responses of larval *Manduca sexta* and their sensitization by noxious stimuli in the laboratory and field. **Journal of Experimental Biology**, 204: 457-469.
- Weiss, M.R. 2003. Good housekeeping: why do shelter-dwelling caterpillars fling their frass? **Ecology Letters**, 6: 361-370.
- Young, A.M. 1978. “Disapperances” of eggs and larvae oh *Helicounius* butterflies (Nymphalidae: Heliconiinae) in Northeastern Costa Rica. **Entomological News**, 89 (2,3): 81-87.
- Zalucki, M.P.; Clarke, A.R. & Malcolm, S.B. 2002. Ecology and behaviour of first instar larval Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, 47: 361-393.

Table 1: Larval survivorship of *Dryas iulia alcionea*, in branches of *Passiflora suberosa*, under the treatments of exclusion and no exclusion of cursorial predators.

Treatment	Survivors		Missing		Total
	N	%	N	%	N
<b>With excl.</b>	19	63.3	11	36.7	30
<b>Without excl.</b>	7	23.3	23	76.7	30
	26	-	34	-	60

$$\chi^2_{(Yates)} = 11,635 \text{ d.f.} = 1; P < 0,001$$

Table 2: Mean instar length (days), mean number of resting-site constructions/instar and mean daily rate/instar of resting-site constructions for *Dryas iulia alcionea* larvae under laboratory conditions (25° C).

	Instar				
	1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	4 <sup>th</sup>	5 <sup>th</sup>
Instar length (days)	3,68±0,80 <sup>a</sup>	3,26±0,86 <sup>b</sup>	3,40±1,23 <sup>b</sup>	4,13±1,54 <sup>b</sup>	5,36±1,95 <sup>a,b</sup>
Resting-site constructions	2,66±0,91 <sup>a</sup>	2,04±1,08 <sup>b</sup>	0,86±0,85 <sup>c</sup>	0,32±0,74 <sup>d</sup>	0,07±0,25 <sup>d</sup>
Daily rate resting-site construction	0,72	0,63	0,25	0,08	0,01

Columns with different letters indicate statistical differences (one-way ANOVA,  $\alpha=0.05$ , with *post hoc* test of Tukey). Instar length: N=427, F= 82.75, p=0.0002. Resting-site constructions for larval instar: N=42, F= 320.02; p<<0.0001.

Figure 1:

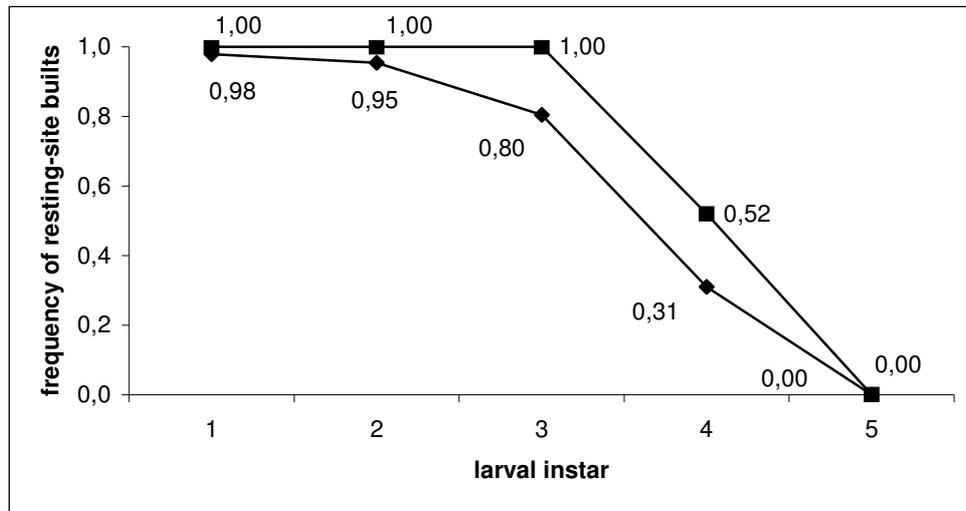


Figure 2:

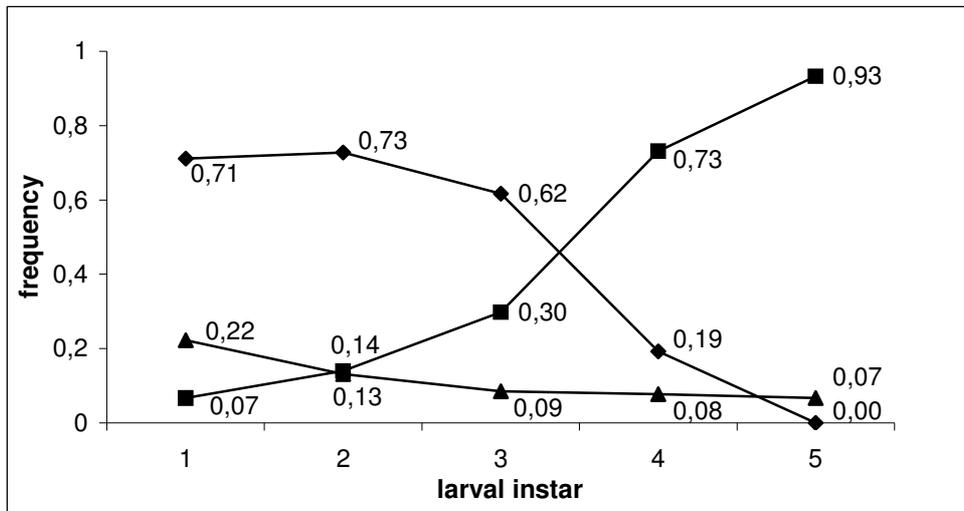


Figure legends:

Figure 1: Relative frequencies of use/building of resting-sites by *Dryas iulia alcionea* (discriminated by larval instar) in *Passiflora suberosa* branches, in nature (lozenge marks, n = 393) and insectary (squares, n = 25). All frequencies differ ( $p < 0,001$ ) from the null hypothesis (frequency = 0.5), except for fourth instar in insectary.

Figure 2: Behaviour and disappearance of larvae of *Dryas iulia alcionea* after the resting-site removal (fifth instar larvae rarely built resting-sites, so they were only removed from the leaves for a few seconds). The lines represent the frequency, on each instar, for the two responses found (reconstruction, lozenge marks; no reconstruction, square marks). Triangles represent caterpillars that disappeared after the beginning of treatment.  $N_{\text{total}} = 382$  larvae (first, 180; second, 114; third, 47; fourth, 26 and fifth, 15).

## **CAPÍTULO 2**



Ethological analysis of the resting-site building behavior in *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera: Nymphalidae) using decision-trees and classic description observations.

Artigo a ser submetido para a revista *Journal of Insect Behavior*.

**Ethological analysis of the resting-site building behavior in *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera: Nymphalidae) using decision-trees and classic description observations, oviposition data and life-tables.**

Nicolás Oliveira Mega<sup>1</sup> and Aldo Mellender de Araujo<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax +55-51-33167311

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax +55-51-33167311

<sup>3</sup>**Corresponding author. E-mail: [aldomel@portoweb.com.br](mailto:aldomel@portoweb.com.br)**

## **Abstract**

As evolutionary response to the attacks of predators, larvae of some Lepidoptera develop a series of defense strategies. Since the caterpillars do not have much mobility, these defenses are generally passive. Ethological approaches can be an excellent starting point of study when we do not know much about the biology of feature species. Here, we analyze ethological events linked to the behavior of build resting-sites, using ethological diagrams, oviposition patterns and survivorship of immature stages. In descriptive terms, the behavior of larvae observed obey a pattern apparently constant. Using ethological diagrams, the general behaviors related to ant avoidance showed consistent patterns. However, were found differences in the behavior and in the frequencies of responses for 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> larval instars, suggesting decrease of behavioral repertory related to ant avoidance. Other ethological findings suggest that these differences become greater in third instar, where frequency of resting-site build decrease greatly, larvae become less sensitive to ant presence and the manner of build resting-sites also suffer modifications. The oviposition data reveal that the higher frequencies of postures were found out of host (38%) and tendrils (32%), while resting-sites scores about 21%. The use of life-table revealed that mortality rate was higher in nature data, suggesting that the predation pressure is extremely elevated in nature in egg and initial immatures stages. Nevertheless, the mortality rate found in laboratory data suggests the presence of a background death rate, present in both environments; it is reasonable to think in inbreeding effects, but we cannot discard pathogenic or parasitic effects. Thus, It is very probable that the relation

of oviposition site preferences and behavioral traits of first instars is a way to win to race for survival, reducing the chances of encounter predators

## **Introduction**

Two major classes of nectaries are commonly found in plants: floral and extrafloral (EFNs). The function of the first group is attract pollinators to the reproductive organs of plants, while EFNs work as attractive to ants, wasp and bugs (eventually spiders), which are all effective predators of caterpillars (Dryer, 1995, 1997). Several reports have shown the relevance of ants as anti-herbivore agents (Schemske, 1980, Oliveira, 1997, Kawano, 1999, Apple & Feener, 2001, Almeida & Figueiredo, 2003 and others), so that they can be considered fundamental to the survival of plants possessing EFNs. In this case, the deterrence of herbivores results from a predatory/aggressive behavior, by the ants against the invader, near the nectar source of the plant (Freitas & Oliveira, 1996).

As an evolutionary response to the attacks of predators, larvae of some Lepidopteran species develop a series of defense strategies. Since the caterpillars do not have much mobility, these defenses are generally passive (Stamp & Casey, 1993). The amount of published papers about defense strategies in caterpillars is considerable. As adaptations (or exaptations) for defense, can be cited morphological traits (scoli, spines, hairs), chemical defense (unpalatability, odors), camouflage/mimicry, myrmecophily, and behavioral traits (mining, regurgitating, hanging by silken treads, grouping, leaf folding and rolling, shelters, frass-chains and resting-sites). Several behavioral traits have been identified in different species of Nymphalidae (Casagrande &

Mielke, 1985; Muyschondt, 1976; DeVries, 1987; Aiello, 1991; Freitas & Oliveira, 1991; 1992). In particular, the behavior of build island-like structures (like resting-site and frass chains), that isolate the larvae of leaf blade, was studied in detail by Freitas & Oliveira (1996) Freitas (1999) e Machado & Freitas (2001).

The construction of island-like structures seems to provide an efficient refuge against cursorial predators, especially ants, while the larva is not foraging (Freitas & Oliveira, 1996), and can be of great importance in the establishment and survival of neonate caterpillars (Zalucki *et. al.*, 2002), as well as for higher instar larvae.

*Dryas iulia* Fabricius (1775) (Lepidoptera, Nymphalidae) is a non-myrmecophilous butterfly that build resting-sites, analogous to other island-like structures found in many larvae of other Lepidopteran species. This butterfly uses *Passiflora* species as hostplant, especially of the *Decaloba* subgenus (older *Plectostema*) (Benson *et. al.* 1975). According to Brown & Yepes (1984) and Brown (1992), the continental populations of South America correspond predominantly of *Dryas iulia alcionea* Cramer (1779).

The construction of resting-sites structures is made basically by herbivory activity ("chew channeling"), where the larva select a place on the leaf, cuts the blade from the margin to the interior and leave a bridge connecting the intact leaf portion and the cut portion (Alexander, 1961); eventually midribs can be use as scaffold to the construction. The separation of the two parts that were cut is drive by the larva weight, witch makes the cut portion makes the structure to part with the rest of the leaf, standing in a hanging position by the bridge connection. In some occasions, the structure can receive silk reinforcement in the bridge connection (structures without midribs scaffold).

Ethological approaches can be an excellent starting point of study when we do not know much about the biology of the species. Much work has been done in this research area (a sample of studies can be found in the textbook by Alcock, 2001). The efforts are usually concentrated in the causes, development and heritability of behavior, communication, socialization and mating systems. Lepidoptera behavioral traits have received much attention of the researchers (Yack *et. al.*, 2001; Walters *et. al.*, 2001; Costa & Varanda, 2002; Jones *et. al.*, 2002; Rayor & Munson, 2002; Zalucki *et. al.*, 2002; Nilsson & Forsman, 2003; Weiss, 2003; Weiss *et. al.*, 2003). Generally, the focus of interest in these publications is larval behavioral adaptation against predators, in other words, defense strategies.

Female oviposition site preferences in the hostplant can also be a strategy to acquire defense against predation on early stages of development. In fact, the oviposition step is particularly crucial in Lepidoptera, because the hatching larvae are often relatively immobile and thus depend on the clear-sighted choice of food plant by the adult female (Renwick & Chew, 1994). The females can be even capable of recognize best plant or host quality for the good development for neonates, as shown for *Heliconius erato phyllis* in shoots of *Passiflora suberosa* (Mugrabi-Oliveira & Moreira, 1996). Moreover, Périco & Araújo (1991) has found evidences indicating that *Dryas iulia* is more specialized than *Heliconius erato*, not only in female choice of plant but in larval development as well.

Although the great ability showed by some female species in select secure oviposition places and best host plant available, some losses in offspring occur. As mentioned by Zalucki *et. al.* (2002), there is an array of predators,

pathogens and parasitoids with which first instars must contend. Not surprisingly, mortality in neonates is high. A useful approach to access this kind of information is the utilization of life-tables, which is a detailed description of the mortality schedule of a population giving the probability of dying and various other statistics at each age (Pressat, 1985).

In the present work, we analyze ethological events associated with the building of resting-sites by larvae of the butterfly *D. i. alcionea*. We focus in the behavioral pattern differences among instars and their importance for larval survival and development; we also speculate about the evolutionary significance of this behavior coupled with the female oviposition behavior for the survival of larvae neonates and later instar based on life-tables prepared for preadult stages.

## **Material and Methods**

Field observations were carried out in a fragment of semi-deciduous forest of Morro Santana, in the outskirts of Porto Alegre, Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. The tests were done from November to April of 2003, and December to April of 2004, in a trail surrounded by secondary forest. At this site, the presence of *Passiflora suberosa* was abundant as well as the occurrence of ants over the vegetation.

Eggs and larvae of *D. i. alcionea* were observed in field and were followed until the end of their development, whenever possible. The responses and the routine of larvae of different instars, in a variety of situations, were annotated. In this process, we try to identify and isolate the larval foraging behavior, as well their reactions to ants or as a consequence of interactions with

ants. These reactions were taken as dichotomy variables in the elaboration of general ethological diagrams.

Our experimental approach consisted in removing caterpillars from their resting sites and observing their reactions. Once larvae of different instars were localized in *P. suberosa* branches, they were removed from their resting-sites and placed again in the leaf blade. The frequency of distinct reactions previously identified in the general ethological diagram was scored to elaborate specific-instar ethological diagrams. As larvae use/build resting-sites more actively until third instar, and in lower frequency until fourth instar (Mega & Araújo, in preparation), we discriminate such reactions only for the firsts four larval instars.

To evaluate if *D. i. alcionea* females can choose the best site for larval development, oviposition preferences were record too. In this way, *P. suberosa* branches were searched for eggs. We also followed females in the field and registered the oviposition sites chosen by the butterflies. We think that if the resting-site build behavior is important to the neonate larvae, and is inherited, females will be able to localize the best places that maximize the chance of survival of the offspring.

As a complement to oviposition study, mortality and survival of larvae of *D. i. alcionea*, from the egg until the emergence of an adult individual, were also estimated. The main objective of this step was to compare if the initial location of eggs and larvae on a plant may well influence its ability of to establish itself on host and survival over the whole development. To access this information, life-tables for field data were obtained (current life-table), as well as for laboratory stock of *D. i. alcionea* immatures (cohort life-table). The laboratory

data were obtained by a cohort stock of *D. i. alcionea* immatures maintained in ideal conditions (temperature 25 °C, 24h light); care to the caterpillars were done daily. Inferences on predation pressure and differential mortality in natural situations were obtained by the comparison of field and laboratory data.

## Results and Discussion

The behavior of larvae observed can be described as follows. Initially, the larva newly hatched from the egg walks from the oviposition site (incidentally this site can be a structure or a place not belonging to the host plant, which is very frequent in *D. i. alcionea*) and search for host leaves (always *Passiflora*, in the present case, *P. suberosa*). When the larva finds the leaf, it starts to build the resting-site. This process is alternate with moments of pause and herbivory, so that after the construction the larva stays quietly in the resting-site until it needs to feed. While it is in the resting-site, larva stays immovable or maintains a “hook position”. This state is typical of some butterflies, when the larva stays with one half of the body in the leaf and other in the air. During foraging, the larva does not move much from the resting-site, returning to it after the feeding period ends. Many times, instead of returning to the structure constructed, the larva stays immovable or jump off from the leaf, hanging by silken threads. In other situations, larvae abandon the leaf and walk through the stem and to neighbor leaves. Nearly always, this behavior occurs after the major part of leaf blade is eaten. It can happen also if the resting-site brakes and fall off from the leaf or if it does not serve more as refuge, due to instability or to short dimensions of the structure built. In the new leaf, the procedure of construction

of another resting-site is resumed again. All this behavior is not devoid of a risk of predation.

According to Smiley (1985) the period when the mortality of larvae is bigger is precisely when the larvae is trying to find a useful place to establish. Given the complexity of the behavior in question, certainly this period is critical to the larvae of *D. i. alcionea*. It is possible to suppose various causes to state that this point is critical for larval survivor; among them, we have the fact that frequently eggs are laid down far from the leaves of the host plant. Hence, after egg hatching, the displacement of larva could bring a great risk of predation to the walking larva. The chance of an encounter with an ant to occur changes with the level of ant visitation, but probably is the moment where it has the major chances of contact between larva and predator.

If the larva reaches the leaves, it still will have to avoid contact with ants until the refuge was done: this is the second moment of vulnerability of neonate caterpillar. After the construction of the rest, larva still will be exposed to ants' attacks during periods of foraging (third moment of vulnerability), since it must abandon the structure that had built to feed. To avoid this later risk, at least partially, larvae try to feed at the margins of refuges, expanding the resting-site into the leaf blade area.

Based on all these observations, we elaborate the ethological diagrams. Seventeen points of choices were identified with 34 distinct responses for the studied larvae. The trees also show five final processes and 14 loop references to four different points in the decision-tree (see details in fig. 1). Between the points of choice, we recognize five invariable processes, present in all larvae observed.

The trees show simple choices made by larvae that can be repeated many times. If the larva was disturbed, the path choice can be altered and the reactions of caterpillar can change. If the field conditions and the presence of ants are not modified, larvae show approximately the same behavioral pattern.

The ethological diagram and the frequencies of choices for first instar are shown in fig. 1. To build the tree we observed 166 ethological events. In general, the larvae for first instar appear to be much affected by the resting-site removal. At this point, it is interesting to note that the majority of larvae observed tried to avoid interactions with ants. The main evasive strategies used by first instar larvae were resting-site utilization and jumping from the leaf blade. It is remarkable that almost 72% of larvae search for a resting-site when they are put again in the leaf blade, after the removal, if there is no approximation of ants (line A, row 2). If an ant walks through the leaf blade, the first reaction of larvae is jump off from the leaf (line A, row 4), staying in suspension by silken threads (line A, row 9); or standing in the leaf, immovable or walking by the leaf surface. It is possible that the reaction of larva were due to the detection of vibrations of the ant's walk. The immobility and walking strategy seems to be the least efficient behavior to avoid a contact with ants, since the majority of the larvae that shows this behavior suffer ant attack (line B, row 6). Just a little part of larvae attacked (28,6%) escape and stands on the leaf blade after the event (line D, row 5); although, just 25% from this group escape uninjured and are able to continue their activities (line E, row 5). However, some larvae that stay in leaf blade when ants are patrolling appear to search for the removed resting-site, touching the place where the structure was before.

The ethological diagram for second instar is show in fig. 2. To build the tree, 125 ethological events were observed. It looks little shorter and less variable than the first instar tree. This dynamics appears to be relative to the increase of larval mobility and strength, since the behavioral repertory to avoid ant contact has decreased.

Other differences can be seen for the higher occurrence of leaf change (line G, row 6) (13%, for first instar, against 18% for second), and the lower rate of conclusion of buildings (line H, row 6) (39%, for first instar, against 31% for second). The modification of these traits can expose walking larvae to ants' attack and decrease the survival chances, except if the larva has develop new strategies to maximize their survivorship. Paim and cols. (2004) have show that the chaetotaxie of *D. i. alcionea* larvae change in the molt to second instar, assuming the final aspect that will be maintained for all resting instar; even the proportion of scoli and spines are the same in second and last instar. Despite these observations, the whole behavior for second instar larvae does not differ much from that found to first instar larvae.

For third instar larvae, the 68 ethological events utilized to assemble the ethological diagram suggests that behavioral differences are more marked in this instar. Besides, there are clear evidences suggesting a decrease in the importance of use resting-sites (fig. 3). As occurred with the second instar ethological diagram in relation to first instar, third instar diagram were simpler that the one obtained for second instar, as exemplified by the absence of larvae of third instar using stick-like structure (floral stems) as refuge (line K, row 12). The same pattern was found for the frequency of choices, where the choice of leaf change was higher for third instar (line G, row 6) (18%, for second instar,

against 32% for third), the rate of conclusion of buildings being lower (line H, row 6) (31%, for second instar, against 23,5% for third).

The decision-tree for fourth instar is show in fig. 4. To build the tree, 50 ethological events were observed and have reveled important features of behavioral defence against ant predation. When compared with third instar ethological diagram, fourth instar ethological diagram looks shorter and simpler, suggesting a decrease in behavioral repertory related to ant presence, the tendency observed since first instar. These results suggest that larvae became less sensible to ant presence with the instar change. Further important feature is that all larvae that encounter an ant after the resting-site removal do not play jumping behavior with posterior hanging by silk treats (line A, row 4). Besides, all these larvae have not suffer ant's attack during the encounter. These results suggest that larvae of fourth instar are not so sensible to ants like the firsts three instar. We do not know the reasons for this resistance, since the chaetotaxy is the same since second instar. It is reasonable to think that, in this case, the size of larva matters to ant predation. Other possible differences could be owing to behavioral changes, like beat and bending behavior; these changes could increase larva aggressiveness, inhibiting ant's attack. Another important difference observed, in comparison to third instar behavior, is the rate of larvae that do not build *denovo* resting-sites after the removal of this structure. While 63.36% of larvae of third instar do not built *denovo* resting-sites, 76.32% of fourth instar larvae exhibit the same behavior. Besides, 76.19% of the third instar larvae that decide to build resting-site finished the construction, while 11.11% of fourth instar larvae show the same behavior. All these results bring

strong evidences that preoccupation of fourth instar larvae with ants that patrol *P. suberosa* branches is not so crucial to their survivorship.

Apart from the decision-tree analysis, other ethological findings suggest that differences become greater from third to the fifth instar. In nature, larvae of first two instars build resting-site from the leaf border to the interior of leaf blade, as described by Alexander (1961). Unusually they build resting-sites using leaf veins, only in cases where the leaf is too young or excessively delicate. Nevertheless, in third instar larvae the construction of resting-sites using veins is more common than border ones. In fourth instar larvae, the rare cases where caterpillars were found using resting-sites, the structures were built using midribs as bridge between leaf blade and refuge area. Essays made with fourth and fifth instar larvae in laboratory, using large and hard *P. suberosa* leaves, reveal that some of the biggest and older larvae can construct and use resting sites from the borders of the leaves, as well as by using primary and secondary veins. In this case, it appears that veins are being used as support for refuge stability, and suggests that the weight of larvae is determinant to build, or not, one or another type of resting-site.

We don't know the exact reasons that lead larvae to change their way to build resting-sites or to give up the construction of these structures. However, field observations have brought evidences that it is possible that the resting-site building behavior is determined by a genetic component that is strongly influenced by environmental conditions, as leaf area and hardness, ant presence, host availability and integrity, climatic features and larval health. Nevertheless, the conflict of interest between building a resting-site, staying safe from the attack of predators, and consuming the leaf blade to avoid starvation

conditions must be weighed by the larvae. In conditions where the host plant are not available in large proportions, it is expected that the larvae of *D. i. alcionea* build less resting-sites and become to consume the leaf area destined the construction.

Oviposition analyses were intriguing and bring interesting results for discussion (fig. 5). The higher frequency of oviposition was found for the category “out of host” (38%); this is surprising, since we expected (based on preliminary observations made in the field) that females would prefer abandoned resting-sites. Oviposition in tendrils was almost 32%, while old, abandoned, resting-sites were chosen in about 21%. All other frequencies of oviposition places were lower than 5%. Nevertheless, when we analyzed the category “out of host” oviposition, we found that 52% of eggs were placed in tendril-like structures, 38% in structures similar to resting-sites and 10% in stick-like structures. It is important to mention that all these structures are dry and made of dead tissue. These ovipositions were found mainly around the host branch (mean distance of 0.50 m).

This results open a discussion relative to the two following questions: (1) does the females of *D. i. alcionea* commit a mistake in the egg laying process, missing the real target of oviposition; or (2) the error is “intentional”, been and adaptive strategy to increase the egg survivorship against ant removing. Searching females in oviposition in the field, showed that about 48% of the eggs were laid around the host branch, the mistake being caused probably by the wind, inadequate posture, female hang instability or interference of surrounding vegetation. The remaining 52% appears to be a consistent choice (“intentional”). Taking into consideration that a single female can put about 300-

400 eggs in all its adult life (which can be more than 30 days - N. Mega, insectary observations), an extreme careful oviposition can be a hard work due to host availability. Thus, it seems that some eggs are laid regardless of the choice of the best sites, but because of the “hurry” to lay the maximum of eggs as possible. In fact, field observations indicate that host recognition and analysis is an elaborate behavioral trait, as much sophisticated as that found in *H. e. phyllis* (Mugrabi-Oliveira & Moreira, 1996), so that *D. i. alcionea* can be considered more specialized (Périco & Araújo, 1991). However, in unsuitable conditions females have no choices other than to lay eggs wherever is possible (N. Mega, field observations, data not published).

The results of differential mortality and survival are shown in table 1A and 1B. In the field, we observed 850 individuals, throughout egg to fifth instar. In laboratory the observations started with 96 eggs, until last instar. As expected, the mortality rate ( $nd_x$ ) was higher for early instars, both in nature and in laboratory conditions. However, this rate was much higher in nature, suggesting that the initial hypothesis of predation pressure over immature stages of *D. i. alcionea* in natural conditions is very strong. Nevertheless, the mortality rate found in laboratory data suggests the presence of a background death rate, which could be present in both environments. Although it is not clear which are the cause of such background mortality, it is reasonable to think that at least in part, inbreeding could play a role in the manifestation of lethal genes and the actuation of pathogens over immatures. Haag and cols. (1993), based in F statistics for enzyme polymorphism of three enzyme systems (EST, LAP, and PGM) and mtDNA RFLPs revealed that inbreeding makes a great contribution to the population homozygosity in *D. i. alcionea*. Moreover, in another paper

dealing with inbreeding effects, Haag & Araújo (1994) estimated the mean number of lethal equivalents per gamete as three. This information could permit infer that at least a part of egg and neonate death is caused by lethal genes manifestation.

Stocks of *D. i. alcionea* maintained independently have brought evidences that major part of deaths in laboratory occur due funguses, virus or parasitoids agents. Funguses are the major cause of mortality in eggs, while virus and parasitoids cause death in the last instars, in particular at the interface of third and fourth instar. An evidence of this effect can be observed in table 1B, where the greatest proportion of those immature alive at age  $x$  that dies in the interval  $(nq_x)$  belongs to fourth instar (0.4179). This value exceeds even the egg mortality (0.1563), a recognized point of great death rate (Zalucki *et. al.*, 2002).

With all these evidences, we can conclude that most part of behavioral patterns found for first to third instar is in accordance with the mortality rates show in life-tables. As larvae seems more sensible to predation in these three instars, it is not surprising that higher frequencies of behavioral traits to avoid predation are in an inverse correlation with larval probability of survival to these periods. Concurrently, if egg mortality is responsible for a great part of death rate, adult female choice could provide more chances of survival to its offspring. In the same direction, a good female's choice of oviposition place will maximize the establishment of neonate larvae, since this is a decisive phase to offspring survivor. Hence, it is very probable that the relation of oviposition site preferences and behavioral traits of first instars is a way to win to race for survival and reduce the chances of encounters with predators.

## References

- Aiello, A. 1991. *Adelpha ixia leucas*: immature stages and position within *Adelpha* (Nymphalidae). **Journal of Lepidopterist Society**, 45: 181-187.
- Alcock, J. 2001. **Animal Behaviour**. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Alexander, A.J. 1961. A study of the biology of the caterpillars, pupae and emerging butterflies of the subfamily Heliconiinae in Trinidad, West Indies. Part I. Some aspects of larval behaviour. **Zoologica**, 46 (1): 1-24.
- Almeida, A.M. & Figueiredo, R.A. 2003. Ants visit nectaries of *epidendrum denticulatum* (orchidaceae) in a brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. Brazilian. **Journal of Biology**, 63(4): 551-558.
- Apple J.L. & Feener Jr, D.H. 2001. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: the effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. **Oecologia**, 127: 409–416.
- Benson, W.W.; Brown Jr, S.; Gilbert, L.E. 1975. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, 29: 659-680.
- Bentley, B.L. 1977. Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 8: 407-427.
- Brown, K.S. 1992. Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal. p. 142-187. *In*: Morellato, L.P.C. (Ed.). **História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. Unicamp/Fapesp, Campinas. 322 p.
- Brown, K.S. & Yepes, F.F. 1984. Los Heliconinii (Lepidoptera, Nymphalidae) de Venezuela. **Boletín Entomológico de Venezuela. N.S.**, 3: 29-76.
- Casagrande, M. M. & Mielke, O. H. H. 1985. Estágios imaturos de *Agrias claudina claudianus* Staudinger (Lepidoptera, Nymphalidae, Charaxinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 29: 139-142.
- Costa, A.A. & Varanda, E.M. 2002. Building of Leaf Shelters by *Stenoma scitiorella* Walker (Lepidoptera: Elachistidae): Manipulation of Host Plant Quality? **Neotropical Entomology**, 31 (4): 537-540.
- DeVries, P. J. 1986. Hostplant records and natural history notes on Costa Rican butterflies (Papilionidae, Pieridae & Nymphalidae). **Journal of Research on the Lepidoptera**, 24: 290-333.
- DeVries, P. J. 1987. **The Butterflies of Costa Rica and their Natural History**. Vol. 1. University Press, Princeton. 327 pp.

- Freitas, A.V.L. 1999. An anti-predation behavior in larvae of *Libytheana carinenta* (Nymphalidae, Libytheanae). **Journal of Lepidopterists' Society**, 53 (3): 130-131.
- Freitas, A.V.L. & Oliveira, P.S. 1992. Biology and behavior of the neotropical butterfly *Eunica bechina* (Nymphalidae) with special reference to larval defense against ant predation. **Journal of Research on the Lepidoptera**, 31: 1-11.
- Freitas, A.V.L. & Oliveira, P.S. 1996. Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. **Journal of Animal Ecology**, 65: 205-210.
- Guimarães, A.A. 2002. **Influência da variação numérica dos nectários extraflorais de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae) na fauna de formicídeos associada**. Msc. Dissertation. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 57pp.
- Haag, K.L; Araujo, A.M. & Zaha, A. 1993. Genetic structure of natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae) revealed by enzyme polymorphism and mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP). **Biochemical Genetics**, 31: 449-460.
- Haag, K. L. & A. M. Araújo. 1994. Inbreeding, genetic load and morphometric variation in natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Genética**, 17(1): 35-39.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990. **The ants**. Harvard University Press, Cambridge, 548 pp.
- Janzen, D.H. 1967. Interaction of the bull's horn acacia (*Acacia cornigera* L.) with an ant inhabitant (*Pseudomyrmex ferruginea* F. Smith) in Eastern Mexico. **University of Kansas Science Bulletin**, 47: 315-558.
- Jones, M.T.; Castellanos, I. & Weiss, M.R. 2002. Do leaf shelters always protect caterpillars from invertebrate predators? **Ecological Entomology**, 27: 753-757.
- Kawano, S., Azuma, H., Ito, M. & Suzuki, K. 1999. Extrafloral nectaries and chemical signals in *Fallopia japonica* and *Fallopia sachalinensis* (Polygoniaceae), and their roles as defenses systems against insect herbivory. **Plant Species Biology**, 14: 167-178.
- Koptur, S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. **Insect-Plants interactions**, vol 4 (ed. E. Bernays). CRC Press, Boca Raton.
- Krebs, J.R. & Davis, N.B. 1993. **An Introduction to Behavioural Ecology**. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

- Machado, G. & Freitas, A.V.L. 2001. Larval defense against predation in the butterfly *Smyrna blomfieldia*. **Ecological Entomology**, 26: 436-439.
- Mugrabi-Oliveira, E. & Moreira, G. R. P. 1996. Size of and damage on shoots of *Passiflora suberosa* (Passifloraceae) influence oviposition site selection of *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 13 (4): 939-953
- Muysshondt, A. 1976. Notes on the life cycle and natural history of butterflies of El Salvador. VII. *Archaeoprepona demophon centralis* (Nymphalidae). **Journal of Lepidopterists Society**, 30: 23-32.
- Nilsson, M. & Forsman, A. 2003. Evolution of conspicuous colouration, body size and gregariousness: a comparative analysis of lepidopteran larvae **Evolutionary Ecology**, 17 (1): 51-66.
- Oliveira, P.S. 1997. The ecological functional os extrafloral nectaries: hebivore deterrence by visiting ants and reproductive output in *Cariocar brasiliense* (Cariocaraceae). **Functional Ecology**, 11, 323-330.
- Oliveira, P.S. & Freitas, A.V.L. 1991. Hostplant record for *Eunica bechina magnipunctata* (Nymphalidae) and observations on oviposition sites and immature biology. **Journal of Research on the Lepidoptera**, 30: 140-141.
- Paim, A.C.; Kaminsky, L.A. & Moreira, G.R.P. 2004. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: IV. *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). **Iheringia, Série Zoológica**, 94: 25-36.
- Penz, C.M. 1999. Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 127: 277-344.
- Périco, E. & Araújo, A.M. 1991. Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae). **Evolución Biológica**, 5: 59-74.
- Pressat, R. 1985. **The Dictionary of Demography**. Bell and Bain Ltda, Glasgow.
- Rayor, L.S. & Munson, S. 2002. Larval feeding experience influences adult predator acceptance of chemically defended prey. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 104: 193-201.
- Renwick, J.A.A. & Chew, F.S. 1994. Oviposition behavior in Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, 39: 377-400.
- Schemske, D.W. 1980. The evolutionary significance of extrafloral nectar production by *Costus woodsonii* (Zingiberaceae): An experimental analysis of ant protection. **Journal of Ecology**, 68: 959-967.

- Smiley, J. 1986. Ant constancy at *Passiflora* extrafloral nectaries: effects on caterpillar survival. **Ecology**, 67:516–521.
- Stamp N. E. & Casey T. M. 1993. **Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging**. Chapman & Hall, New York.
- Yack, J.E.; Smith, M.L. & Weatherhead, P.J. 2001. Caterpillar talk: Acoustically mediated territoriality in larval Lepidoptera. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, 25; 98 (20): 11371–11375.
- Zalucki, M.P.; Clarke, A.R. & Malcolm, S.B. 2002. Ecology And Behavior Of First Instar Larval Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, 47: 361-393.
- Walters, E.; Illich, P.; Weeks, J.; & Lewin, M. 2001. Defensive responses of larval *manduca sexta* and their sensitization by noxious stimuli in the laboratory and field. **Journal of Experimental Biology**, 204(3): 457-469.
- Weiss, M.R. 2003. Good housekeeping: why do shelter-dwelling caterpillars fling their frass? **Ecology Letters**, 6 (4): 361-370.
- Weiss, M.R.; Lind, E.M.; Jones, M.T.; Long, J.D.; Maupin, J.L. 2003. Uniformity of Leaf Shelter Construction by Larvae of *Epargyreus clarus* (Hesperiidae), the Silver-Spotted Skipper. **Journal of Insect Behavior**, 16 (4): 465-480.

Figure 1:

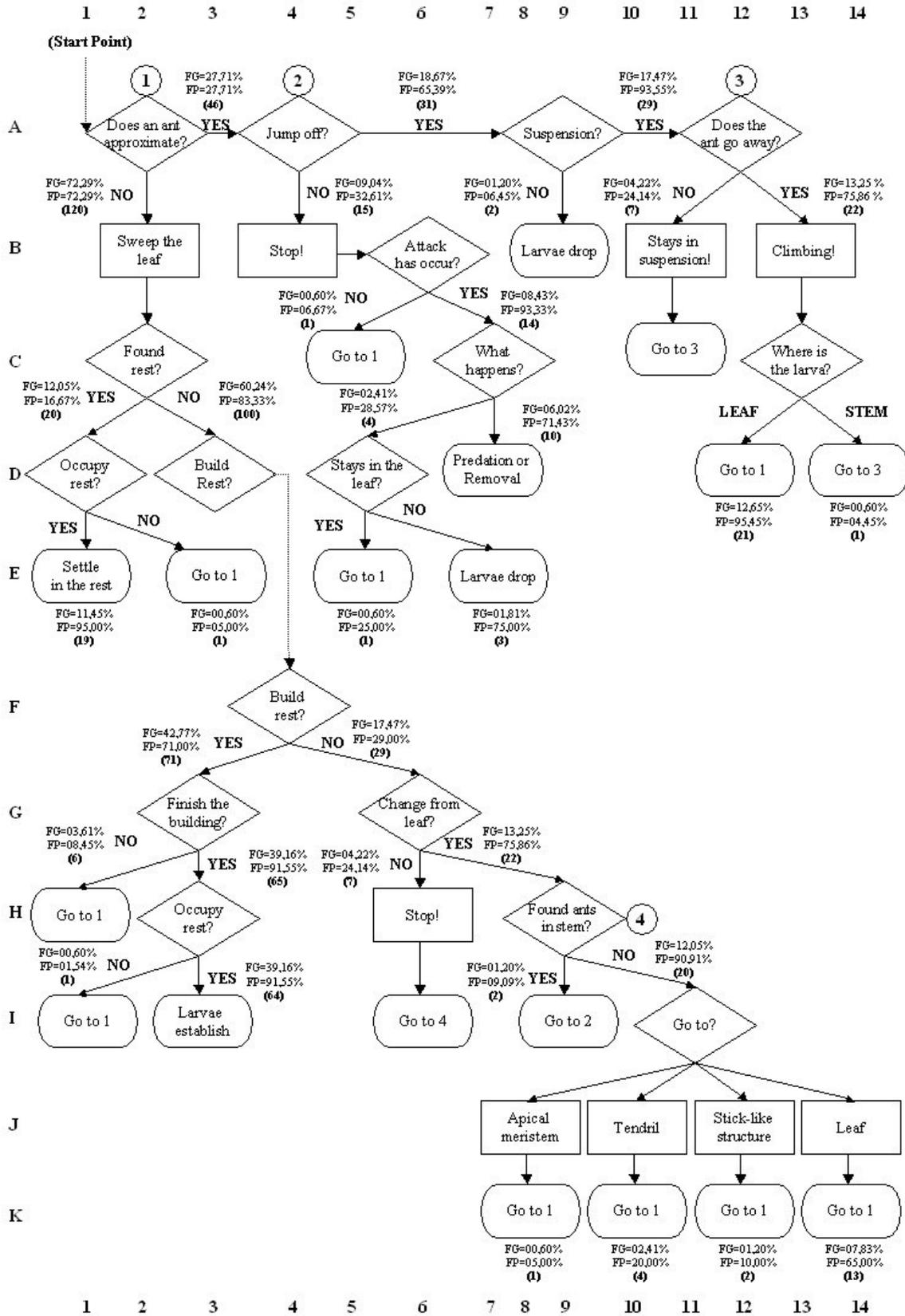


Figure 2:

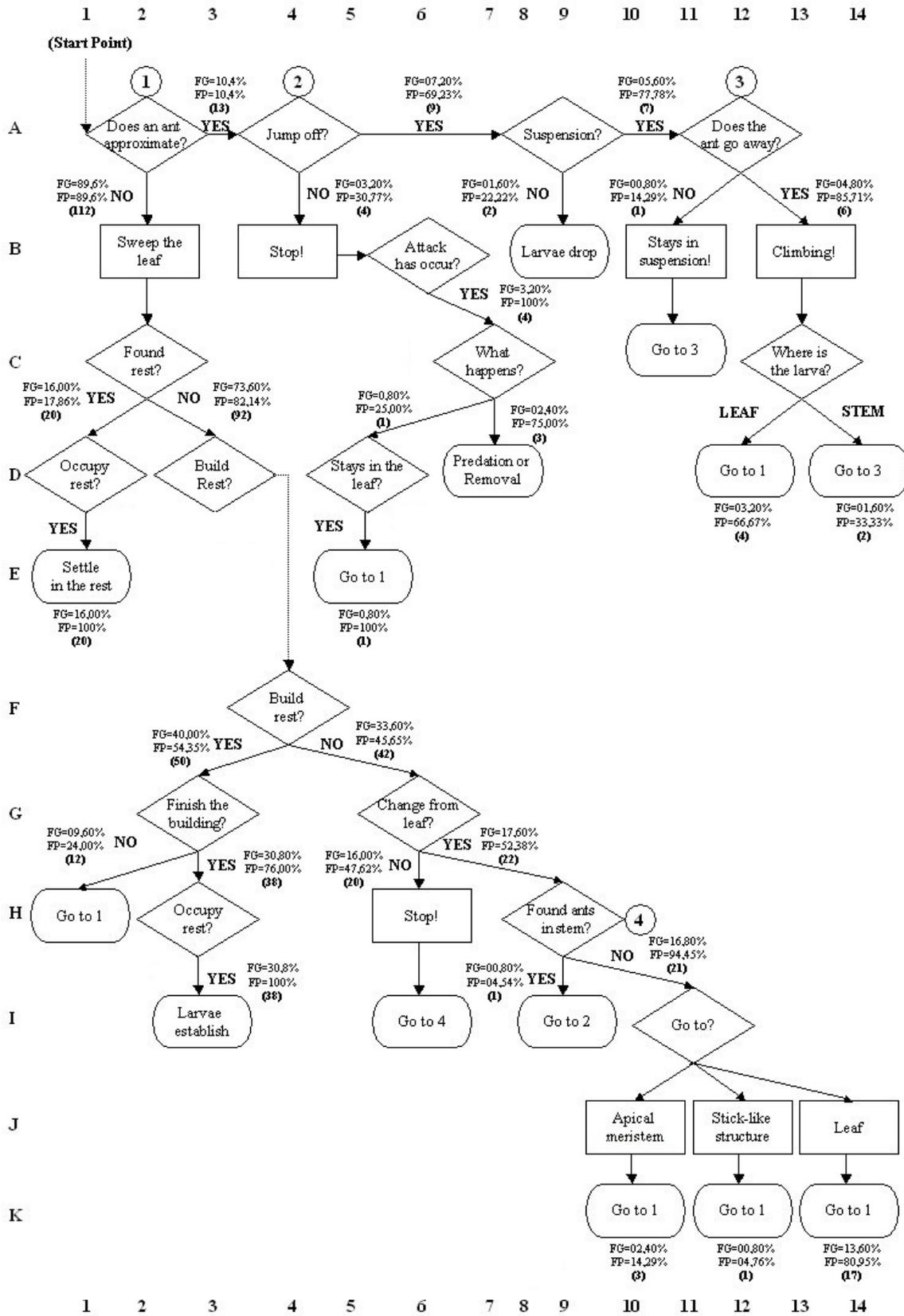


Figure 3:

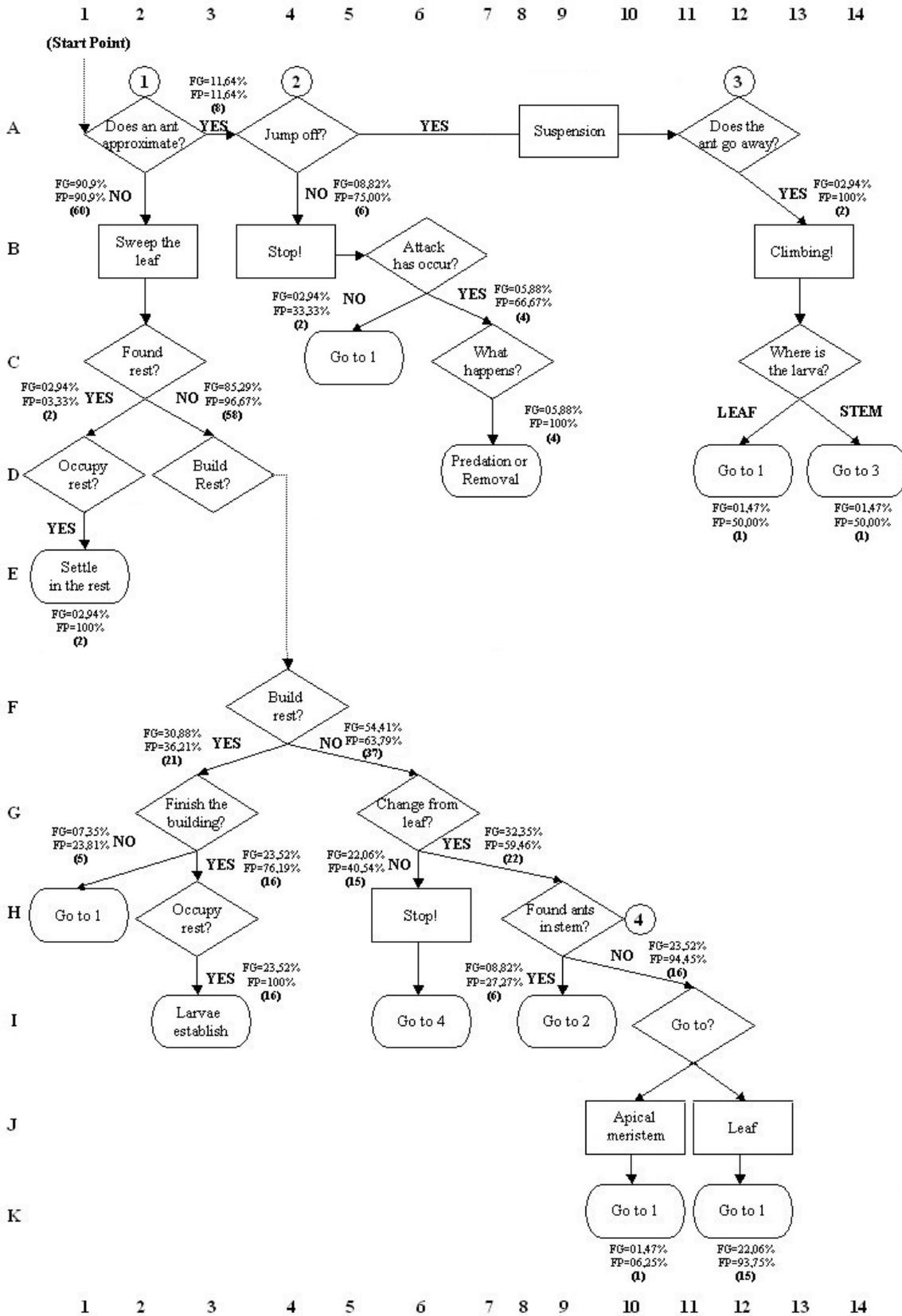


Figure 4:

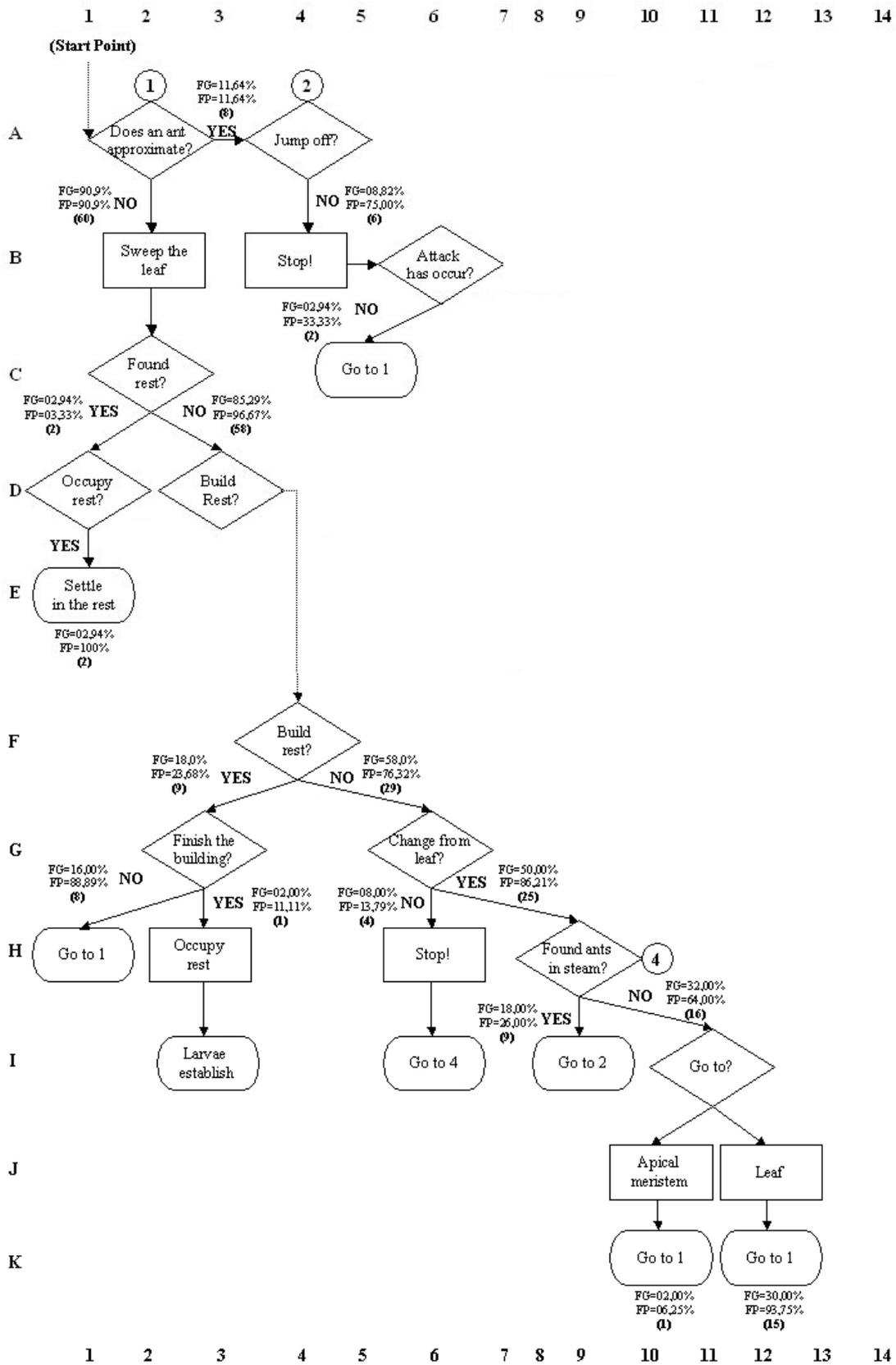


Figure 5:

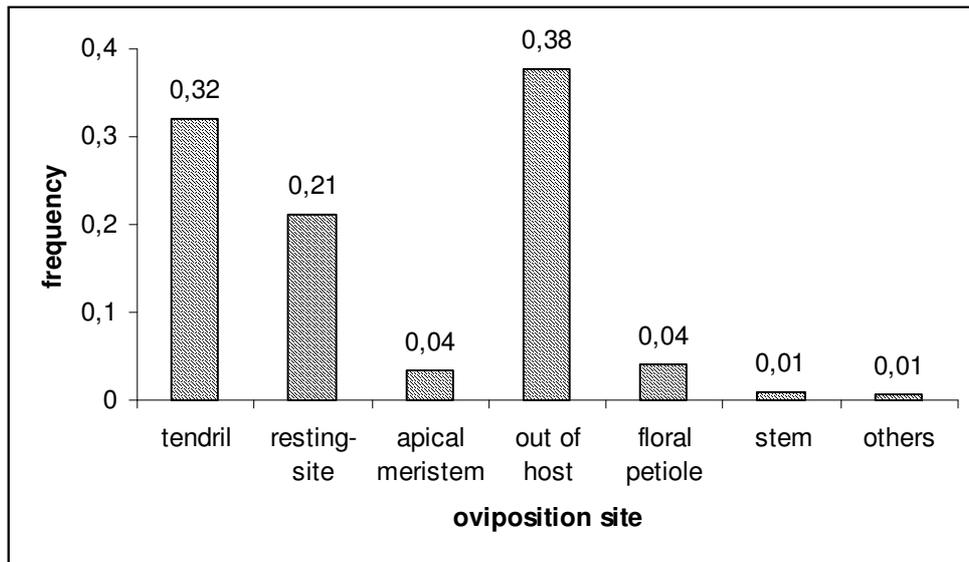


Figure legends:

Figure 1: Ethological decision trees for larval behavior after resting-site removal for first instar (sample size = 166 observations). The beginning of observations (start point), just after the resting-site removal, is indicated in upper left corner. Lozenge indicate choice events, squares represent invariable processes, and rounded squares define end processes or loop links. Arrows show the direction of the events; bold words above the arrows indicate event decision. The frequencies of answers are shown at the side of larval decision or above the decision arrows (FG, absolute frequency taking into account the overall observations per instar; FP, absolute frequency taking into account the the overall observations per choice event). The numbers (rows) above and below the figure and the letters (lines) at the left side of figures indicate the coordinates of decision tree.

Figure 2: Ethological decision trees for larval behavior after resting-site removal for second instar (sample size = 125 observations). The beginning of observations (start point), just after the resting-site removal, is indicated in upper left corner. Lozenge indicate choice events, squares represent invariable processes, and rounded squares define end processes or loop links. Arrows show the direction of the events; bold words above the arrows indicate event decision or above the decision arrows. The frequencies of answers are shown at the side of larval decision (FG and FP idem fig. 1). Shaded symbols indicate events with null frequencies. The numbers (rows) above and below the figure and the letters (lines) at the left side of figures indicate the coordinates of decision tree.

Figure 3: Ethological decision trees for larval behavior after resting-site removal for third instar (sample size = 68 observations). The beginning of observations (start point), just after the resting-site removal, is indicated in upper left corner. Lozenge indicate choice events, squares represent invariable processes, and rounded squares define end processes or loop links. Arrows show the direction of the events; bold words above the arrows indicate event decision or above the decision arrows. The frequencies of answers are shown at the side of larval decision (FG and FP idem fig. 1). The numbers (rows) above and below the figure and the letters (lines) at the left side of figures indicate the coordinates of decision tree.

Figure 4: Ethological decision trees for larval behavior after resting-site removal for fourth instar (sample size = 50 observations). The beginning of observations (start point), just after the resting-site removal, is indicated in upper left corner. Lozenge indicate choice events, squares represent invariable processes, and rounded squares define end processes or loop links. Arrows show the direction of the events; bold words above the arrows indicate event decision or above the decision arrows. The frequencies of answers are shown at the side of larval decision (FG and FP idem fig. 1). The numbers (rows) above and below the figure and the letters (lines) at the left side of figures indicate the coordinates of decision tree.

Figure 5: Frequency of oviposition-site preferences, under field conditions, for females of *Dryas iulia alcionea* in *Passiflora suberosa* branches.

Table 1: Life-tables for *Dryas iulia alcionea* immature stages. A) Field data (current life-table). B) Laboratory data (cohort life-table). Age interval ( $x$ ), number alive at the beginning of interval ( $K_x$ ), number of deaths in the age interval ( $D_x$ ), fraction alive at the beginning of age interval ( $l_x$ ), proportion of those alive at age  $x$  that survive through the interval ( $np_x$ ), fraction of the original cohort that die in the age interval ( $nd_x$ ), proportion of those alive at age  $x$  that die in the interval ( $nq_x$ ), per capita fraction alive in the age interval ( $nL_x$ ), total number of days of life beyond age  $x$  ( $T_x$ ) expected number of days that individuals aged  $x$  will live ( $e_x$ ). As field data for the age index ( $x$ ) are not know for *D. iulia*, this parameter was estimated based in laboratory conditions.

A)

Immature Stage	$x$	$K_x$	$D_x$	$l_x$	$np_x$	$nd_x$	$nq_x$	$nL_x$	$T_x$	$e_x$
Egg	0-5,27	457	266	1,0000	0,4179	0,5821	0,5821	3,7363	6,1914	6,1914
1 <sup>st</sup> instar	5,27-8,95	191	83	0,4179	0,5654	0,1816	0,4346	1,2039	2,4551	5,8742
2 <sup>nd</sup> instar	8,95-12,21	108	62	0,2363	0,4259	0,1357	0,5741	0,5493	1,2512	5,2946
3 <sup>rd</sup> instar	12,21-15,62	46	17	0,1007	0,6304	0,0372	0,3696	0,2798	0,7020	6,9738
4 <sup>th</sup> instar	15,62-19,75	29	10	0,0635	0,6552	0,0219	0,3448	0,2169	0,4221	6,6524
5 <sup>th</sup> instar	19,75-25,11	19	3	0,0416	0,8421	0,0066	0,1579	0,2053	0,2053	4,9368

B)

Immature Stage	$x$	$K_x$	$D_x$	$l_x$	$np_x$	$nd_x$	$nq_x$	$nL_x$	$T_x$	$e_x$
Egg	0-5,27	96	15	1,0000	0,8438	0,1563	0,1563	4,8583	17,1295	17,1295
1 <sup>st</sup> instar	5,27-8,95	81	7	0,8438	0,9136	0,0729	0,0864	2,9708	12,2713	14,5437
2 <sup>nd</sup> instar	8,95-12,21	74	1	0,7708	0,9865	0,0104	0,0135	2,4959	9,3004	12,0654
3 <sup>rd</sup> instar	12,21-15,62	73	6	0,7604	0,9178	0,0625	0,0822	2,4865	6,8045	8,9484
4 <sup>th</sup> instar	15,62-19,75	67	28	0,6979	0,5821	0,2917	0,4179	2,2801	4,3180	6,1870
5 <sup>th</sup> instar	19,75-25,11	39	5	0,4063	0,8718	0,0521	0,1282	2,0379	2,0379	5,0164

#### 4. DISCUSSÃO GERAL:

Os resultados obtidos no experimento onde alguns ramos de *Passiflora suberosa* tiveram o acesso de predadores cursoriais excluídos mostraram que 60% das larvas contidas nos ramos onde não havia formigas atingiram o estágio adulto, enquanto somente cerca de 27% das larvas em ramos sem exclusão de predadores atingiram o estágio adulto. Estas diferenças foram estatisticamente significativas e mostram claramente que a presença de predadores cursoriais (formigas) em plantas de *P. suberosa* influencia fortemente a sobrevivências de larvas de *D. iulia*. De acordo com a hipótese protecionista para a evolução e surgimento dos NEFs, as formigas nectarívoras seriam atraídas pelo o néctar, rico em açúcares e aminoácidos (Bentley, 1977). Outras formigas, caçadoras cursoriais ativas, também desempenhariam a função de guardiãs das plantas, porém, neste caso, a defesa é conseguida indiretamente, sem que haja um aparente atrativo que as estimule a circular sobre os ramos e folhas da planta.

Guimarães (2002), estudando NEFs de *P. suberosa* e a fauna de formigas associada, encontrou um forte relação entre o número de NEFs, bem como o volume de néctar produzido e a frequência de visitação de formigas em ramos da planta. Kessler & Baldwin (2002) também citam diversos outros trabalhos onde resultados similares foram obtidos. Estudos de composição de néctar secretado por NEFs também são conhecidos e alguns trabalhos mostram que pode existir variação nas espécies que patrulham a planta dependendo da composição da solução secretada. Estudos com este tipo de detalhamento não foram realizados com passifloráceas. Entretanto é possível que exista também variação na composição do néctar dependendo da espécie

e da tensão ecológica. Neste sentido, são necessários mais estudos para se entender melhor estas relações do que outras.

Por outro lado, os dados encontrados para uso/construção de refúgios por larvas de *D. iulia* em *P. suberosa* acrescentam evidências extras à discussão. Em ambiente de insetário, por exemplo, a construção de refúgios foi registrada até quarto estágio, mas, neste último, em pequena frequência quando comparada com as larvas de estágios anteriores. De fato, é interessante notar que até terceiro estágio, 100% das larvas constroem e usam refúgios, enquanto que no quinto estágio não foram registradas tais ações. Na natureza, estes resultados mostram-se um pouco diferentes do que nos ambientes controlados. Como observado em insetário, foi registrado uso e construção de refúgios até quarto estágio, sem que o mesmo comportamento se repetisse no quinto estágio. Entretanto, existem diferenças visíveis quanto às frequências de construção/uso de refúgios em insetário e na natureza. Na natureza, boa parte das larvas deixa de fazer refúgios já em terceiro estágio; e apenas uma pequena parcela das larvas de quarto estágio constroem estes refúgios. A dinâmica de construção desses refúgios, ou de estruturas análogas, varia entre certas espécies ou grupos de Lepidoptera. Em *Eunica bechina*, um comportamento análogo é encontrado do primeiro ao quarto estágio (Freitas & Oliveira, 1996); em *Smyrna blomfieldia*, as larvas constroem refúgios até terceiro estágio (Machado & Freitas, 2001), enquanto que em *Libytheana carinenta*, padrões comportamentais similares são encontrados durante todos os estágios larvais (Freitas, 1999a).

Os motivos que fazem as larvas deixarem de construir refúgios em estágios mais tardios está fundamentado no vigor adquirido pela larva de

tamanho avantajado e em comportamentos desempenhados pelas larvas nestes estágios. Batimentos-reflexos são bastante comuns e vigorosos nestas larvas, o que faz deste comportamento uma intimidação muito forte para eventuais predadores. Estudos realizados com larvas da mariposa *Manduca sexta* mostram que, ao ser perturbada, os comportamentos de intimidação por batimentos e/ou curvatura corporal ocorrem instantaneamente após o estímulo, e ocorrem com maior intensidade em estádios maiores (Walters *et. al.*, 2001). São muito raros os casos onde são desenvolvidas estruturas morfológicas novas que possam ser usadas como recursos defensivos, já que, na grande maioria dos casos, a quetotaxia e as características estruturais mais marcantes são alteradas somente na primeira muda (Paim *et al.*, 2004; Kaminski *et. al.*, 2002; Tavares *et. al.*, 2002; Fleming, 1960). Entretanto, é comum que estruturas morfológicas aumentem suas dimensões e fiquem mais complexas até o último estágio larval (A.V.L. Freitas, comunicação pessoal). Nesse sentido, larvas em estádios de desenvolvimento mais tardios poderiam apresentar vantagens adaptativas em relação a larvas mais jovens e com estruturas morfológicas menos avantajadas e complexas.

Em ambientes experimentais controlados, a frequência de uso/construção é mais alta em larvas de estádios menores. A diferença em relação a ambientes naturais é que foram encontradas, em frequências baixas, larvas de primeiro, segundo e terceiro estágio que não usam/constroem refúgios. De fato, pode ser observada uma tendência de decréscimo na frequência de uso/construção dos refúgios à medida que as larvas vão ficando mais velhas, até atingirem o estado de pupa. Entretanto, apesar da tendência descrita, existe uma brusca alteração de frequências no período que engloba

terceiro e quarto estádios, como pode ser visto na curva de construção/uso de refúgios apresentada no capítulo 1 (Fig. 1). Nesta curva, as frequências caem muito a partir do terceiro estádio, alcançando valores relativamente baixos no quarto estádio. Este dado sugere que podem existir alterações nos mecanismos de defesa da larva a partir deste ponto; estas ainda não foram estudadas.

Esta curva decrescente poderia ser explicada pela falta de pressão de seleção exercida pelas formigas na atividade das larvas. Assim, a alteração do comportamento das larvas, influenciada pelas formigas, poderia ocorrer pela ausência dos predadores, que permitiria que larvas que não apresentem o comportamento de construção de refúgios sobrevivam. Neste caso, variantes genéticas de baixo valor adaptativo e em frequência pequena na população poderiam aparecer, pois não existiria força seletiva para selecioná-las. Seria possível supor, então, que a ausência de estímulos ecológicos das formigas faria com que certas larvas não apresentassem o comportamento por falta de incitação ambiental. Não sabemos as causas exatas que conduzem a esta dinâmica, mas nós supomos que larvas mais velhas e maiores desenvolvam defesas contra predadores cursoriais, como tamanho corporal avantajado ou comportamento agressivo (batimento, agitação, curvamento).

Os dados obtidos para o ciclo de vida de *D. iulia* também adicionam informações importantes para a compreensão do comportamento em questão. O ciclo de vida total médio, para as larvas criadas em laboratório, alcançou quase 33 dias. Pode-se notar na figura 2 do capítulo 1 que os níveis de desenvolvimento mais demorados foram o período de pupa, bem como ovo e quinto estádio. Estes resultados não são surpreendentes, visto que os estágios

de ovo e pupa são onde ocorrem as maiores transformações fisiológicas e morfológicas, enquanto que o último estágio de desenvolvimento é crucial para a estocagem de reservas e nutrientes necessários para que seja formada uma forma adulta saudável. Comparado com dados obtidos para a espécie *Heliconius erato phyllis*, estes dados indicam que o ciclo de vida para *D. iulia* seja efetivamente mais curto. Não sabemos se existem fatores evolutivos por trás desta diferença na taxa de desenvolvimento. Estudos adicionais seriam necessários para que maiores inferências sejam feitas.

O número de refúgios construído durante o ciclo de vida completa as informações fornecidas pelo estudo dos dias de desenvolvimento. Foi encontrado que o número médio de refúgios construídos por estágios imaturos durante todo o período larval é de aproximadamente seis. Isso representa que as larvas constroem pelo menos um refúgio por estágio larval se considerarmos constante a taxa de construção dos refúgios durante todos os estágios. Entretanto, quando olhamos detalhadamente para os diferentes estágios, pode-se notar que a taxa de construção é dependente do nível de desenvolvimento larval. De fato, foi encontrado que existe um decréscimo na construção de refúgios do primeiro para quinto estágio. Neste sentido, os dados de regressão relacionando a duração do ciclo de vida com o número de refúgios construídos no período indica uma relação inversa entre estes dois conjuntos de dados. Assim a tendência principal deste comportamento é que quanto maior for o estágio, menor é a quantidade de refúgios construídos.

Os motivos que levam as larvas a deixarem de construir refúgios não estão claros e não existem informações precisas sobre esse tema na bibliografia. Foram formuladas três diferentes hipóteses na tentativa de explicar

esta dinâmica: (i) o uso de refúgios contra predadores cursoriais se torna menos útil à medida que as larvas atingem estádios maiores, porque as larvas desenvolvem outras estratégias de defesa mais eficientes para evitar o risco causado por formigas; (ii) o grande tamanho corporal alcançado pelas larvas torna impraticável a construção de um refúgio fisicamente estável; e (iii) é preferível utilizar a disponibilidade de folhas de *P. suberosa* como recurso alimentar, ao invés de usá-las com abrigo. Neste caso, a área foliar que seria destinada à construção do refúgio é aproveitada na nutrição da larva, garantindo o correto desenvolvimento dos últimos estádios.

Apesar dos motivos do abandono do comportamento não terem sido testados até o momento, sugerimos que os sinais que fazem com que a larva não apresente mais o comportamento em questão ocorram devido a uma interação entre as duas causas hipotetizadas.

Os traços comportamentais e o desaparecimento das larvas, após o procedimento de remoção dos refúgios, foram mostrados no capítulo 2. As mais altas taxas de reconstrução de refúgios foram encontradas para o primeiro estágio, bem como as maiores taxas de desaparecimento (maior vulnerabilidade das larvas). As menores taxas, tanto de reconstrução como de desaparecimento, foram encontradas para quarto e quinto estádios. Curiosamente, as frequências para terceiro estágio mostraram padrões intermediários entre os dois estádios iniciais e os dois finais. Estas larvas apresentaram altos valores de reconstrução de refúgios, como encontrado para segundo e terceiro estádios, enquanto que o desaparecimento das larvas foi representativamente baixo, como no quarto e quinto estádios. Estes resultados sugerem que a utilidade dos refúgios como abrigo contra predadores cursoriais,

decrece após o terceiro estágio. Para os dois primeiros estágios, parece que o uso dos refúgios providencia defesas mais eficientes, funcionando realmente como um refúgio contra predadores cursoriais. Entretanto, para os últimos três estágios restantes, esta afirmação parece não ser verdadeira. É possível que as construções para terceiro, quarto e quinto estágios sejam devidas mais ao seguimento de traços genéticos carregados pela espécie do que uma real função protetora. Este argumento é reforçado pela observação de características comportamentais, que indicam diferenças entre o comportamento de construção de refúgios de primeiro e segundo estágios, quando comparado com os traços apresentados por terceiro e quarto (Alexander, 1961, Mega & Araújo, dados não publicados). Como já citado anteriormente, não sabemos os exatos motivos que induzem as larvas a trocar os padrões de comportamento.

Levando em consideração os dados apresentados até agora a idéia inicial de que os refúgios aumentam a sobrevivência das larvas de *D. iulia* em plantas de *P. suberosa* parece ser verdadeira. Entretanto, deve ser ressaltado que a importância deste comportamento parece ser maior nos estágios iniciais. Este comportamento parece ser uma maneira da larva permanecer isolada da superfície da folha, evitando encontros indesejáveis com formigas que estejam patrulhando as folhas. Estes encontros nunca foram observados em refúgios, uma vez que formigas não invadem estas estruturas. Supostamente, os motivos que fazem estes predadores cursoriais não patrulharem estas estruturas particulares são relativos à própria anatomia dos membros locomotores das formigas. Como ela possuem patas separadas, a escalada de formigas de tamanho avantajado nos refúgios é complicada. Formigas de

tamanho muito pequeno eventualmente escalam estas estruturas, entretanto estas espécies não atacam as larvas presentes no refúgio (A.V.L. Freitas, observação pessoal). Apesar disto, Freitas & Oliveira (1996) sugerem que comportamento análogo encontrado em *Eunica bechina* não precisaria ter evoluído em resposta ao risco de predação em plantas visitadas por formigas, uma vez que comportamentos semelhantes ocorrem em várias espécies de Nymphalidae e outros grupos fora desta família, como alguns Pieridae e inclusive, mariposas. De fato, quando analisamos diferentes grupos de Lepidoptera é possível identificar traços sutis que diferenciam padrões de comportamento. As principais diferenças ocorrem na localização e na forma em que são construídos os refúgios, e também nos materiais empregados para a construção. No primeiro caso, as variações observadas indicam que pode haver utilização de veias foliares de grosso calibre (primárias e secundárias) na construção do refúgio, ou ainda o aproveitamento de zonas foliares com pouca concentração de veias grossas. Além disso, podem ser usados as zonas centrais das folhas ou ainda o bordo foliar. Em termos de materiais usados, as diferenças se devem à utilização ou não de fezes e seda na confecção do refúgio.

De qualquer forma, concordamos com a opinião de Freitas (1999a) de que todos estes comportamentos representam diferentes maneiras de manter as larvas isoladas da lâmina foliar, sendo que a ocorrência deste comportamento em diversas linhagens de Lepidoptera mostra que a fixação desta característica em muitos casos pode ser explicada por pressão de predação. Este parece ser o caso do grupo composto pelas espécies do gênero *Dryas*, *Dryadula* e *Philaetria*, que exibem características

comportamentais comuns na construção de refúgios. Neste trabalho, parece que o comportamento de construir refúgios é, de fato, a construção de um abrigo. Este abrigo, deve ter sido uma importante característica na sobrevivência da linhagem que gerou todo o grupo filético. Além disso, é possível que este comportamento tenha surgido como uma característica adaptativa que se fixou na linhagem ancestral e se difundiu pelas espécies do grupo em questão.

Em termos descritivos, o comportamento das larvas observadas obedece a um padrão praticamente constante. Inicialmente, a larva recém eclodida do ovo come o córion do ovo e sai do local de oviposição à procura de uma folha na planta hospedeira (sempre *Passiflora* e no caso presente, *P. suberosa*). Quando a larva encontra a folha, o trabalho de construção do refúgio começa. Este processo é alternado com momentos de pausa para herbivoria, de modo que a larva permanece no refúgio até quando necessita se alimentar. Enquanto ela permanece no refúgio, a larva permanece imóvel ou mantém um estado de gancho, de modo que o terço anterior da larva permanece dobrado. Este estado é típico de algumas larvas de borboletas, como na subfamília Ithomiinae, onde a larva permanece com metade do corpo na folha e outra metade do ar.

Durante o forrageamento, a larva não se afasta muito do refúgio, retornando para ele sempre que uma formiga aparece. Muitas vezes, ao invés de retornar para a estrutura construída, a larva permanece imóvel ou pula da folha, mantendo-se suspensa por fios de seda. Passado o momento de perigo, a larva retorna para a folha. Em certas observações de campo, foi possível notar que se uma formiga persiste em permanecer patrulhando, por longos

períodos de tempo, o local por onde a larva se mantém suspensa, a larva é capaz de ficar suspensa por quanto tempo for necessário. Em outras situações, as larvas saem da folha onde vivem e andam pelo caule da hospedeira até as folhas vizinhas. Este comportamento pode ser extremamente perigoso, pois expõe a larva a uma considerável chance de encontro com formigas patrulheiras; no entanto ele é necessário para a nutrição larval. A ocorrência deste comportamento está praticamente sempre ligada ao consumo da folha, ocorrendo quando a maior parte da lâmina foliar já foi comida. Ele pode ocorrer também se o refúgio cai da folha ou já não serve mais como abrigo, devido à instabilidade ou às pequenas dimensões. Se a larva sobrevive a esta aventura, ela constrói um novo refúgio em uma nova folha, abandonando a primeira folha que serviu como abrigo e comida.

De acordo com Smiley (1985), o período onde a mortalidade das larvas é maior é precisamente quando a larva está se estabelecendo. Zalucki *et. al.*, (2002), também mencionam uma série de trabalhos mostrando que mortalidade em neonatos é a maior logo após eclosão. Levando em consideração a complexidade do comportamento em questão, certamente este também período é crítico para as larvas de *D. iulia alcionea*. A causa deste perigo iminente vem do fato de que muitas vezes os ovos desta borboleta são postos afastados das folhas da planta hospedeira. Conseqüentemente, após a eclosão do ovo, o deslocamento da larva pode trazer grande risco de predação para as larvas em estabelecimento. A chance de encontrar uma formiga neste movimento varia com o grau de visitação das formigas, mas provavelmente este é o momento onde existe maior chance de contato entre larva e predador.

Uma vez atingida a folha, a larva ainda terá que evitar contato com formigas até que o refúgio esteja pronto. Neste período é comum que as larvas permaneçam atentas às formigas que perambulam pela folha, procurando evitar ao máximo e encontro acidentais. Após a construção do refúgio, a larva ainda terá que ficar exposta aos ataques de formigas enquanto estiver forrageando, uma vez que a larva tem que abandonar parcialmente a estrutura que construiu para se alimentar. Para evitar este ponto de mortalidade, pelo menos parcialmente, as larvas tentam se alimentar das margens do refúgio, expandindo sua área para dentro da folha.

As árvores de decisão, elaboradas através das observações descritas anteriormente, permitem uma análise mais detalhada das variações etológicas do comportamento de construção de refúgios e sua funcionalidade ecológica do que quando realizadas por etologia clássica descritiva.

Quando comparadas com as observações clássicas, as árvores representam de maneira mais dinâmica a seqüência de comportamentos. Foram identificados 17 pontos de escolha e 34 respostas diferentes. Entre os pontos de escolha foram identificados alguns processos invariáveis, apresentados por todas as larvas em todos os estádios larvais. Além disso, as árvores mostraram ter poucos processos terminais, mas muitas referências tipo "loop". Isso significa que o comportamento em si não é seqüencial, mas que, dependendo do estímulo, a larva pode tomar caminhos diferentes de decisão ou retornar a pontos anteriores.

De forma geral, as árvores mostram que simples escolhas feitas pelas larvas podem ser repetidas quantas vezes seja necessário ou possível. Entretanto, não há apenas uma linha de características comportamentais a ser

seguida desde a perda/abandono do refúgio até a ocupação ou construção de um novo abrigo. De fato, se a larva for perturbada, o caminho de escolha pode ser alterado e as reações da larva podem mudar. Esta constatação não invalida a estrutura hierárquica dos comportamentos descritos para as larvas de *D. iulia*, apenas reforça o fato de haver certa plasticidade etológica nas árvores de decisão, bem como a capacidade de alteração de conduta se assim for necessário. Assim, se as condições ambientais e a presença de formigas e outros predadores não for modificada, a linha de tendências comportamentais indicada pelas árvores será obtida.

De modo geral, o resultado das freqüências de escolhas e alterações de comportamentos indicou que as larvas de primeiro estágio parecem ser bastante afetadas pela remoção do refúgio. Neste ponto, é interessante notar que a maioria das larvas observadas tentou evitar interações com formigas. A principal estratégia evasiva usada pelas larvas de primeiro estágio foi a utilização de refúgios e o comportamento de suspensão por fios de seda, após a aproximação de predadores ou estímulo perturbador. É importante destacar que praticamente 72% das larvas procuram por um refúgio quando elas são postas novamente na lâmina foliar, após a remoção do refúgio. Se houver aproximação de formigas no limbo foliar, a primeira reação da larva é correr em direção ao bordo foliar, pulando da folha e permanecendo em suspensão por um fio de seda; outra estratégia é permanecer imóvel na folha. Esta parece representar um último recurso para evitar o contato com o predador, uma vez que a maioria das larvas que mostram este comportamento sofre ataques ou são mortas. Apenas uma pequena parte das larvas atacadas escapa da agressão e permanece na lâmina foliar após o evento; contudo, apenas um

quarto deste grupo escapa ileso dos ataques e são capazes de continuar suas atividades. É interessante notar que algumas larvas que permanecem nas folhas da hospedeira, enquanto formigas estão patrulhando, parecem procurar pelo refúgio removido, tocando e vasculhando diversas vezes o local onde anteriormente havia o refúgio. Nesse sentido, larvas que correm em direção aos bordos foliares poderiam, na verdade, estar correndo para seus refúgios. Alexander (1961) menciona em seu trabalho que as larvas de *D. iulia* estão entre as que apresentam a maior velocidade de deslocamento dentro da subfamília Heliconiinae. Aliando o uso de refúgios e a capacidade de deslocamento rápido das larvas, parece coerente pensar que as larvas tentam abrigar-se no refúgio quando detectam a presença de algum organismo andarilho na folha onde se encontram.

Para o segundo estágio, a árvore construída a partir de 125 observações, parece um pouco menor e menos variável que a de primeiro estágio. Esta dinâmica parece ser relativa ao aumento da mobilidade larval e ao fortalecimento das larvas. O ponto principal deste argumento vem da observação das freqüências encontradas para a queda da folha após um ataque de formiga, bem como do uso de gavinhas como abrigo após a troca de folha. Em ambos os casos, as freqüências encontradas são menores para segundo estágio. No primeiro caso, resistir a um ataque é uma característica que requer bastante força. No segundo caso, larvas que se deslocam por grandes distâncias costumam alternar períodos de atividade com pausa (Alexander, 1961); para efetuar uma pausa é necessário achar um local seguro para o descanso. Se a larva precisa parar menos por distância percorrida, esta

característica aumentaria o valor adaptativo do indivíduo. Parece ser o caso de larvas de segundo estágio.

Outras evidências deste fortalecimento larval vêm de diferenças encontradas para certas frequências de escolhas, como pode ser observado por uma maior taxa de troca de folha e menor frequência de conclusão da construção de refúgios. A modificação destas características poderia expor as larvas que estão se deslocando ao ataque de formigas, diminuindo suas chances de sobrevivência, se houvessem certas modificações sutis no comportamento e morfologia das larvas que compensasse a alteração das escolhas larvais. Paim *et. al.* (2004), mostraram que existe uma série de modificações que ocorrem na morfologia na larva durante a primeira muda. Certamente estas modificações estão ligadas a alterações fisiológicas, o que poderia modificar significativamente o comportamento destas larvas. Entretanto, apesar de todas estas observações, o comportamento das larvas de segundo estágio não difere muito do encontrado para primeiro estágio. É possível que essa semelhança comportamental, em relação à presença de formigas e à construção de refúgios, seja devida à pressão de predação exercida por formigas, que para ambos os níveis ainda é bastante elevada.

Para as larvas de terceiro estágio, as diferenças são mais evidentes e mostram um padrão aparentemente de menor importância para o uso de refúgios. Assim como na árvore de decisão do segundo estágio em relação ao primeiro, a árvore de decisão de terceiro estágio foi mais simples do que a obtida para segundo estágio, no sentido que não são encontradas larvas de terceiro estágio usando pedúnculos florais como refúgio. O mesmo padrão foi encontrado para as frequências de escolha, onde a decisão de abandonar a

folha hospedeira foi maior para o terceiro estágio (32% contra 18% no 2º estágio), bem como a taxa de conclusão da construção de refúgios foi mais baixa (23,5% contra 31% no 2º estágio).

Além da análise das árvores de decisão, outros achados etológicos sugerem que as diferenças se tornam maiores a partir do terceiro estágio. Na natureza, as larvas dos dois primeiros estágios constroem refúgios a partir do bordo foliar em direção ao interior da lâmina da folha, como descrito por Alexander (1961), que chamou este comportamento de *channeling*. Raramente elas constroem refúgios utilizando as veias das folhas, somente nos casos onde a folha é muito jovem ou excessivamente delicada. Contudo, nas larvas de terceiro estágio a construção de refúgios usando veias é mais comum do que os refúgios construídos a partir dos bordos foliares. Em larvas de quarto estágio, nos raros casos onde são encontradas larvas utilizando refúgios, estes são construídos usando a veia central como ponte entre a lâmina foliar e a área do refúgio. Este comportamento foi chamado por Alexander (1961) de *bridging*. Apesar desta autora ter notado a diferença de comportamento entre os tipos de construções diferentes, ela não fez qualquer alusão ao estágio larval onde estes comportamentos são identificados. Até onde temos conhecimento, esta é primeira vez em que é que tal distinção é feita na literatura. Testes piloto feitos com larvas de quarto e quinto estágio em ambiente de laboratório, usando folhas de *P. suberosa* de grande tamanho, fortes e coriáceas indicaram que algumas das maiores e mais antigas larvas podem construir refúgios a partir dos bordos foliares, bem como usando nervuras primárias e secundárias. Neste caso, parece que as veias são usadas como arcabouço para a

estabilidade do refúgio, sugerindo que o peso das larvas é determinante para a construção, ou não, de um tipo ou outro de refúgio.

Não se sabem os motivos exatos que levam as larvas a trocar sua maneira de construir refúgios ou para deixá-los de construir. Entretanto, pensamos que o comportamento de construção dos refúgios é determinado por um componente genético que é fortemente influenciado por condições ambientais, como a área e dureza foliar, presença de formigas, disponibilidade e integridade da planta hospedeira (é preferível usar a folha como alimento, nas condições de pouca quantidade e qualidade do alimento, do que desperdiçar consideráveis áreas foliares na construção de refúgios), condições climáticas e estado de saúde da larva (presença de agentes patogênicos). Neste último caso, testes piloto realizados em laboratório indicaram que larvas infectadas pelo vírus da polihedrose nuclear não costumam construir refúgios, passando boa parte de sua vida restante paradas na centro da lâmina foliar. A bibliografia sobre os efeitos patogênicos, alterações fisiológicas e modificações nos padrões de expressão gênica causadas pela ação deste grupo de vírus é bastante volumosa (Shapiro, 2000, 2001). Portanto, não é surpreendente que a infecção pelo vírus altere o comportamento das larvas de *D. iulia alcionea*.

A análise de oviposição trouxe resultados importantes à discussão da funcionalidade e evolução do comportamento de construção de refúgios em *D. iulia*. Surpreendentemente, a maior quantidade de ovos depositados pelas fêmeas foi fora da planta hospedeira, somando 38% das posturas de ovos. Inicialmente, era esperado que a maior frequência de oviposição fosse encontrada para refúgios abandonados, que alcançou 21% dos casos observados e ficou na terceira posição de preferência, enquanto que o segundo

lugar em frequência foi observado para gavinhas, com 32% das preferências. Todos os demais locais de oviposição foram menores do que 5% das observações, sendo que a soma de todos as demais posturas não alcançou 10% do total. Entretanto, quando analisamos os sítios onde os ovos foram postos fora da planta hospedeira, encontramos que mais da metade dos ovos são postos em estruturas tipo gavinha (secas e já contorcidas), 38% são postas em estruturas similares a refúgios e 10% em estruturas tipo talo (semelhantes a pedúnculos florais ou fragmentos de caule). É importante mencionar que todas estas estruturas eram compostas de tecidos vegetais secos e mortos. Curiosamente, todas estas oviposições foram concentradas ao redor da planta hospedeira.

Estes resultados abrem uma discussão relativa as duas seguintes questões: (1) as fêmeas de *D. iulia* cometem erros no processo de oviposição dos ovos, ou (2) o erro é “intencional”, sendo um comportamento adaptativo para aumentar a sobrevivência dos ovos contra a remoção e predação promovida por formigas? O acompanhamento de fêmeas em oviposição mostrou que praticamente metade dos ovos posta ao redor do ramo da hospedeira ocorrem através de atos equivocados, causado por vento, instabilidade na posição de postura da fêmea ou interferência de outras borboletas e da vegetação dos arredores. A outra metade das posturas parece ser um ato proposital causado por escolhas selecionadas. Nestes casos, a fêmea sobrevoa diversas vezes a planta hospedeira e, mesmo encontrando um local de fácil acesso e de aparente boa localização, desvia seu alvo para os arredores da plantas. Levando em consideração que uma única fêmea pode por de 300-400 ovos durante todo seu ciclo de vida, que pode alcançar de 30-

45 dias (Garcias, 1983; N. Mega, observações de insetário, dados não publicados), um cuidado exagerado durante a oviposição pode ser um árduo trabalho dependendo da disponibilidade da hospedeira. Estudos realizados anteriormente dão certo suporte a esta hipótese. Garcias (1983) encontrou evidências preliminares sugerindo que as fêmeas de *D. iulia* investem muito tempo e grande parte de seus recursos reprodutivos na postura de ovos nos primeiros 10 dias de ciclo reprodutivo. Comparando nossas observações de insetário com os dados de Garcias (1983), isso sugere que sejam postos de 30-40 ovos por dia. Como esta espécie se alimenta somente de néctar, sugere-se que tal característica em relação as oviposições ocorra devido às escassas reservas de nitrogênio que a larva carrega. Tal comportamento não é observado em certas espécies do gênero *Heliconius*, que são altamente seletivas no processo de postura de ovos, distribuindo seus recursos reprodutivos ao longo de toda sua vida adulta. Neste caso, a ingestão pólen aumentaria as reservas de nitrogênio das fêmeas, nutriente esse que é essencial para a produção de ovos viáveis. Assim, parece que alguns ovos são postos descuidadamente, não devido à incapacidade das fêmeas de *D. iulia* em escolher os melhores lugares para oviposição, mas devido à pressa em por o maior número de ovos possíveis no menor período de tempo, uma vez que as reservas de nitrogênio são escassas e podem acabar rapidamente.

De fato, observações de campo indicam que o reconhecimento e análise da hospedeira são características comportamentais elaboradas em *D. iulia alcionea*, tão sofisticadas quanto às encontradas para *Heliconius erato phyllis* (Mugrabi-Oliveira & Moreira, 1996). Inclusive, Périco & Araújo (1991) sugerem que *D. iulia* apresente um comportamento mais sofisticado, de modo que ela

seja mais especializada em processos de escolha de hospedeira do que *H. erato phyllis*. Contudo, em condições extremas e na ausência de plantas hospedeiras de ótima qualidade, *D. iulia alcionea* pode por ovos em locais não muito adequados. Pode ser que este comportamento não cause tantos problemas ao desenvolvimento das larvas destas espécies, já que larvas de *D. iulia* apresentam mandíbulas muito fortes (Paim *et. al.*, no prelo), o que as permitiriam se alimentarem a partir de folhas velhas, coriáceas e um tanto quanto endurecidas. Uma vez que estas folhas geralmente são de baixa qualidade nutricional, é possível que as larvas de *D. iulia alcionea* também possuam uma grande capacidade de digestão e aproveitamento de nutrientes foliares. De fato, é comum a observação de larvas desta espécie se alimentando vivendo em parte velhas da planta hospedeira (Alexander, 1961; N. Mega, observações pessoais), tendo sido sugerido que esta dinâmica poderia ocorrer por exclusão competitiva com larvas de *H. erato phyllis* (Benson, 1978), que só se alimenta e se desenvolve em partes jovens e tenras das passifloras.

Os dados obtidos a partir da mortalidade e sobrevivência diferencial de estágios imaturos, obtidos em campo e em laboratório, também trazem resultados importantes para a discussão aqui apresentada. Como esperado, a taxa de mortalidade foi maior para os estágios iniciais, tanto na natureza como em condições de laboratório. Porém, esta taxa foi muito maior na natureza, corroborando a hipótese inicial de que a pressão de predação sobre estágios imaturos de *D. iulia*, em condições naturais é extremamente alta. Todavia, a taxa de mortalidade encontrada em criações de laboratório sugere a presença de uma taxa de mortalidade de fundo, presente tanto na natureza com em

condições controladas. Não sabemos as causa exatas desta mortalidade de fundo. Não obstante, é razoável pensar em efeitos de endocruzamento conduzindo a manifestação de genes letais, bem como na atuação de patógenos e parasitóides sobre os estágios imaturos. Haag *et. al.* (1993), baseados na estatística F para polimorfismos de três sistemas enzimáticos e padrões de RFLPs de mtDNA revelaram que o endocruzamento tem uma grande contribuição na homoziguidade das populações de *D. iulia alcionea*. Em outro estudo, baseado em marcadores morfológicos, Haag e Araújo (1994) estimaram que o número médio de equivalentes letais por gameta é igual a três. Levando em consideração estas informações, nós podemos argumentar que é possível que pelo menos uma parte da mortalidade de fundo seja devido a genes letais. Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade que uma porção das mortes seja devida a agentes patogênicos ou parasitos, que podem ter vindo através dos ovos coletados na natureza e levados para laboratório e insetário.

As informações coletadas junto a outras criações de *D. iulia* em laboratório trazem evidências que a maioria das mortes, devido a agentes patogênicos ocorre na interface terceiro-quarto estágio (N. Mega, observações pessoais, dados não publicados). Uma evidência deste efeito pode ser observada na tabela de vida construída para dados de laboratório, onde a maior proporção dos que estão vivos na idade  $x$  e que morrem no intervalo  $(nx)$  é equivalente ao período do quarto estágio. Estes valores superam inclusive a mortalidade dos ovos, que é um reconhecido ponto de grande taxa de mortes (Zalucki *et. al.*, 2002).

Com todas estas evidências, podemos concluir que a maior parte dos padrões de comportamento encontrado de primeiro a terceiro estágio estão de acordo com as taxas de mortalidade encontradas nas tabelas de vida. Como as larvas parecem ser mais sensíveis aos predadores nestes três estágios, não é de se admirar que as maiores frequências de características comportamentais para evitar a predação estejam em uma correlação inversa com a probabilidade de sobrevivência nestes períodos. Por outro lado, se a mortalidade dos ovos mostra ser elevada, a escolha da fêmea adulta pode providenciar mais chances de sobrevivência para sua descendência. Assim, é muito provável que a relação entre as preferências de local de oviposição e as características comportamentais dos primeiros estágios larvais sejam um modo de ganhar a corrida pela sobrevivência e reduzir as chances de encontro com predadores.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aiello A (1991) *Adelpha ixia leucas* immature stages and position within *Adelpha* (Nymphalidae). J Lepid Soc 45: 181-187.
- Aiello A and Solis MA (2003) Defense mechanisms in Pyralidae and Choreutidae: Fecal stalactites and escape holes, with remarks about cocoons, camouflage and aposematism. J Lepid Soc 57: 168-175.
- Alcock J (2001) Animal Behaviour (7ed). Blackwell Scientific Publications. Oxford. 584pp.
- Alexander AJ (1961) A study of the biology of the caterpillars, pupae and emerging butterflies of the subfamily Heliconiinae in Trinidad, West Indies. Part I. Some aspects of larval behaviour. Zoologica 46 (1): 1-24.
- Bacher S, Casas J, Wäckers FL and Dorn S (1997) Substrate vibrations elicit defensive behaviour in leafminer pupae. J Insect Physiol 43: 945-952.
- Beattie AJ (1985) The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms. Cambridge University Press, Cambridge, 182 pp.
- Benson WW, Brown Jr S and Gilbert LE (1975) Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. Evolution 29: 659-680.
- Bentley BL (1977) Extrafloral nectaries and protection by pugnacious bodyguards. Annu Rev Ecol Syst, 8: 407-427.
- Brown KS (1992) Borboletas da Serra do Japi: diversidade, habitats, recursos alimentares e variação temporal. p. 142-187. In: Morellato, L.P.C. (Ed.). História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. Unicamp/Fapesp, Campinas. 322 pp.
- Brown KS and Yepes FF (1984) Los Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) de Venezuela. Bol Entomol Venez NS 3: 29-76.
- Casagrande MM and Mielke OHH (1985) Estágios imaturos de *Agrias claudina claudianus* Staudinger (Lepidoptera, Nymphalidae, Charaxinae). Rev Bras Entomol 29: 139-142.
- Cervi AC (1997) Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. Fontqueria 45: 1-92.
- Costa AA and Varanda EM (2002) Building of Leaf Shelters by *Stenoma scitiorella* Walker (Lepidoptera: Elachistidae): Manipulation of Host Plant Quality? Neotrop Entomol 31 (4): 537-540.
- DeVries PJ (1987) The Butterflies of Costa Rica and their Natural History. Vol. 1. Princeton University press, New Jersey. 327 pp.

- DeVries PJ (1991) Foam barriers, a new defense against ants by milkweed butterfly caterpillars. *J Res Lepid* 30: 261-266.
- Ehrlich PR and Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Elias TS and Gelband H (1975) Nectar: its production and functions in Trumpet Creeper. *Science* 189: 289-291.
- Evans DL and Schmidt JO (1990) Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predator. University Press, New York, 482 pp.
- Freitas AVL (1999a) An anti-predation behavior in larvae of *Libytheana carinenta* (Nymphalidae, Libytheanae). *J Lepid Soc* 53 (3): 130-131.
- Freitas AVL (1999b) Nymphalidae (Lepidoptera), Filogenia com Base em Caracteres de Imaturos, com Experimentos de Troca de Plantas Hospedeiras. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 178pp.
- Freitas AVL and Oliveira PS (1992) Biology and behavior of the neotropical butterfly *Eunica bechina* (Nymphalidae) with special reference to larval defense against ant predation. *J Res Lepid* 31: 1-11.
- Freitas AVL and Oliveira PS (1996) Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *J Anim Ecol* 65: 205-210.
- Garcias, G (1983) Aspectos da Biologia Populacional de Cinco Espécies de Heliconiíneos do Anel Mimético "Laranja" (Lepidoptera, Nymphalidae). Dissertação de Mestrado (Genética). Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 88pp.
- Groehs RW (2000) Comportamento de larvas de primeiros instares de *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera; Nymphalidae), sobre folhas de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). Dissertação de Bacharelado em Ciências Biológicas – ênfase ambiental. UFRGS, Porto Alegre, 12 pp.
- Guimarães AA (2002) Influência da variação numérica dos nectários extraflorais de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae) na fauna de formicídeos associada. Dissertação de Mestrado (Biologia Animal). Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 57pp.
- Haag KL, Araujo AM and Zaha A (1993) Genetic structure of natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae) revealed by enzyme polymorphism and mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Bioch Gen* 31(9-10): 449-460.

- Haag KL and Araújo AM (1994) Inbreeding, genetic load and morphometric variation in natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera, Nymphalidae). *Rev Bras Gen* 17(1): 35-39.
- Hölldobler B and Wilson EO (1990) *The ants*. Harvard University Press, Cambridge, 548 pp.
- Inouye DW and Taylor Jr OR (1979) A temperate region plant-ant seed-predator system: Consequences of extra floral nectar secretion by *Helianthella quinquenervis*. *Ecology* 60(1): 1-7.
- Jansen DH (1967) Interaction of the bull's horn acacia (*Acacia cornigera* L.) with an ant inhabitant (*Pseudomyrmex ferruginea* F. Smith) in Eastern Mexico. *Univ Kansas Sci Bull*, 47: 315-558.
- Jones MT, Castellanos I and Weiss MR (2002) Do leaf shelters always protect caterpillars from invertebrate predators? *Ecol Entomol* 27: 753-757.
- Kessler A and Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 299-328.
- Killip EP (1938) *The American species of Passifloraceae*. Publ. Field Mus. Bot. Ser. 19: 1-613.
- Koptur S (1992) Extrafloral nectry-mediated interactions between insects and plants. *Insect-Plants interactions*, vol 4 (ed. E. Bernays). CRC Press, Boca Raton, 81-129.
- Krebs JR and Davis NB (1993) *An Introduction to Behavioural Ecology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 420pp.
- Letourneau DK (1983) Passive aggression: an alternative hypothesis for the *Piper-Pheidole* association. *Oecologia* 60: 122-126.
- Letourneau DK (1990) Code of ant-plant mutualism broken by parasite. *Science* 248: 215-217.
- Macdougall JM and Jørgensen PM (2001) *Passifloraceae*: Depiction of a special poster included in the Missouri Botanical Garden 2001 Calendar. In: Missouri Botanical Garden 2001 Calendar. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis.
- Machado G and Freitas AVL (2001) Larval defense against predation in the butterfly *Smyrna blomfieldia*. *Ecol Entomol* 26: 436-439.
- Mega NO (2002) Evolução e ecologia de duas espécies de maracujás nativos do Rio Grande do Sul: *Passiflora caerulea* e *P. tenuifila* (Passifloraceae). Trabalho apresentado como conclusão de curso para obtenção do título de Bacharel na área Molecular, Celular e Funcional do Curso de Ciências Biológicas. UFRGS, Porto Alegre.

- Mondin CA (2001) *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae): primeira citação de ocorrência para o Rio Grande do Sul. *Pesq Bot* 51: 147-150.
- Montllor CB and Bernays EA (1993) Invertebrate Predadores and the Caterpillar Foraging. *In*: Nancy E. Stamp & Timothy M. Casey (Eds). 1993. *Caterpillars Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging*. Kluwer Academic Publishers, Boston. 548 pp.
- Mugrabi-Oliveira E and Moreira GRP (1996) Size of and damage on shoots of *Passiflora suberosa* (Passifloraceae) influence oviposition site selection of *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Rev Bras Zool* 13 (4): 939-953.
- Muysshondt A (1976) Notes on the life cycle and natural history of butterflies of El Salvador. VII. *Archaeoprepona demophon centralis* (Nymphalidae). *J Lepid Soc* 30: 23-32.
- Ness JH (2003) *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. *Oecologia* 134(2): 210-218.
- Nilsson M and Forsman A (2003) Evolution of conspicuous colouration, body size and gregariousness: a comparative analysis of lepidopteran larvae *Evol Ecol* 17 (1): 51-66.
- Oliveira PS and Freitas AVL (1991) Hostplant record for *Eunica bechina magnipunctata* (Nymphalidae) and observations on oviposition sites and immature biology. *J Res Lepid* 30(1-2): 140-141.
- Paim AC, Kaminsky LA and Moreira GRP (2004) Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: IV. *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Iheringia, Sér. Zool.* 94: 25-36.
- Penz CM (1999) Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. *Zool J Lin Soc* 127: 277-344.
- Périco E and Araújo AM (1991) Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera; Nymphalidae). *Evol Biol* 5: 59-74.
- Pressat R (1985) *The Dictionary of Demography*. Bell and Bain Ltda, Glasgow, 516pp.
- Rayor LS and Munson S (2002) Larval feeding experience influences adult predator acceptance of chemically defended prey. *Entomol Exp Appl* 104: 193-201.
- Renwick JAA and Chew FS (1994) Oviposition behavior in Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 39: 377-400.

- Schemske DW (1980) The evolutionary significance of extrafloral nectar production by *Costus woodsonii* (Zingiberaceae): An experimental analysis of ant protection. *J Ecol* 68: 959-967.
- Shapiro M (2000) Effect of two granulosis viruses on the activity of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J Econ Entomol* 93(6): 1633-1637.
- Shapiro M (2001) Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. *J Econ Entomol* 93(3): 572-586.
- Smiley JT (1985) *Heliconius* caterpillar mortality during establishment on plants with and without attending ants. *Ecology* 66: 845-849.
- Stamp NE and Casey TM (1993) Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging. Chapman & Hall, New York. 587 pp.
- Vecchia M (2001) Il genere Passiflora. (meio eletrônico: [www.passiflora.it](http://www.passiflora.it))
- Walters E, Illich P, Weeks J and Lewin M (2001) Defensive responses of larval *Manduca sexta* and their sensitization by noxious stimuli in the laboratory and field. *J Exp Biol* 204(3): 457-469.
- Weiss MR (2003) Good housekeeping: why do shelter-dwelling caterpillars fling their frass? *Ecol Lett* 6 (4): 361-370.
- Weiss MR, Lind EM, Jones MT, Long JD and Maupin JL (2003) Uniformity of Leaf Shelter Construction by Larvae of *Epargyreus clarus* (Hesperiidae), the Silver-Spotted Skipper. *J Ins Behav* 16 (4): 465-480.
- Yack JE, Smith ML and Weatherhead PJ (2001) Caterpillar talk: Acoustically mediated territoriality in larval Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25; 98 (20): 11371–11375.
- Zalucki MP, Clarke AR and Malcolm SB (2002) Ecology and behaviour of first instar larval Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* 47: 361-393.