



CAROLINA MILLÁN-JIMÉNEZ

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA DE *Passiflora suberosa* LINNAEUS E
CONSEQÜÊNCIAS NA HERBIVORIA POR DUAS ESPÉCIES DE
HELICONÍNEOS (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal do Instituto de Biociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Morfologia comparada

Orientador: Prof. Dr. Gilson Rudinei Pires Moreira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre

2012

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA DE *Passiflora suberosa* LINNAEUS E
CONSEQÜÊNCIAS NA HERBIVORIA POR DUAS ESPÉCIES DE
HELICONÍNEOS (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE)**

CAROLINA MILLÁN-JIMÉNEZ

Aprovada em

“... acredito que volarás al lado de tus mariposas, y será siempre así, aún después de tejer tus propias alas”

Dedico esta tesis a mi abuelo Miguel Jiménez, en agradecimiento a todo lo que su sabiduría y amor me enseñaron en vida, que en paz descansa.

AGRADECIMENTOS

A mi orientador Prof. Gilson R. P. Moreira por abrir las puertas de su laboratorio, por su profesionalismo y su dedicación permanentes y por su acompañamiento continuo en el transcurso de mi maestría.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de mestrado

Al laboratorio de Fisiología Vegetal de la UFRGS en especial ao Prof. Arthur Germano Fett Neto e Helio Nitta, por el cultivo y tratamiento inicial de las plántulas usadas en mi trabajo.

A mis colegas de laboratorio y amigos, Sabrina Campos Thiele, Danessa Boligon, Rosangela Brito, Denis da Silva e Bruna Ramos por la ayuda que me prestaron con el cuidado de mis mariposas, sus importantes aportes, consejos, su grata compañía, todos los momentos y las mejores carcajadas que juntos hicieron mi trabajo aún más maravilloso.

A mis amigos Filipe Bianchi, Kim Barão, Verônica Alves, Ana Kristina Silva e Andressa Caporale de Castro por su ayuda incalculable cargando vasos de plantas, colectando mis mariposas y trabajando junto conmigo para que al final todo resultara de la mejor forma.

A mi familia amada Luis Fernando Millán, Alicia Jiménez e Paola Millán por apoyarme siempre en mis planes y estar siempre presentes a pesar de la grande distancia que nos separó durante estos 2 años.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
Capítulo 1 INTRODUÇÃO GERAL	1
A planta hospedeira.....	1
O Gênero <i>Passiflora</i> Linnaeus.....	1
<i>Passiflora suberosa</i> Linnaeus	2
Subfamília Heliconiinae.....	3
Heliconiini e <i>Passiflora</i>	4
<i>Heliconius erato phyllis</i> e <i>Dryas iulia alcionea</i>	5
Referências Bibliográficas.....	7
Capítulo 2 Plasticidade fenotípica nas folhas de <i>Passiflora suberosa</i> Linnaeus e conseqüências na herbivoria por duas espécies de heliconíneos (Lepidoptera: Nymphalidae).....	15
Resumo.....	16
Palavras-chave.....	17
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	19
Resultados.....	23
Discussão.....	30
Referências.....	36
Capítulo 3 Avaliação preliminar da existência de competição entre <i>H. erato phyllis</i> e <i>D. iulia</i> (Lepidoptera: Nymphalidae) <i>alcionea</i> no estágio de larva em <i>P. suberosa</i> Linnaeus.....	45
Resumo.....	46
Palavras-chave.....	46
Introdução.....	46

Material e Métodos.....	48
Resultados.....	50
Discussão.....	56
Referências Bibliográficas.....	58
Capítulo 4 Considerações finais.....	60
Anexo 1 Normas para publicação na Oecologia.....	62

RESUMO

A plasticidade fenotípica é reconhecida como uma das principais fontes de diversidade, principalmente em relação às espécies vegetais. *Passiflora suberosa* Linnaeus apresenta dois morfotipos denominados formas “verde” e “roxa”. A forma roxa, que está associada a maior rigidez foliar, é resultado da ativação da síntese de antocianinas e derivados fenólicos, como resposta fenotípica ao estresse por incidência de luz solar. A alteração da cor foliar pode influenciar a escolha de oviposição pelas fêmeas de Heliconiini, as quais são capazes de avaliar caracteres morfológicos da planta hospedeira usando a visão. Os lepidópteros *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) e *Dryas iulia alcionea* (Cramer, 1779) (Nymphalidae) utilizam no estágio larval plantas de Passifloraceae como hospedeiras, as quais são partilhadas quanto à idade da folha. Neste estudo, determinou-se o uso de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* em relação aos fenótipos verde e roxo de *P. suberosa*. Para tal, foram conduzidos experimentos de preferência de oviposição em condições semi-naturais, preferência alimentar das larvas em laboratório e performance. De forma geral, o fenótipo roxo foi menos escolhido pelas fêmeas e pelos imaturos desses heliconíneos. Fêmeas e larvas de *H. erato phyllis* mostraram uma preferência marcante pelo fenótipo verde em testes tanto sem chance como de dupla escolha e oviposição, respectivamente, exibindo uma alta mortalidade e adultos de menor tamanho no fenótipo roxo; enquanto larvas de primeiro instar de *D. iulia alcionea* consumiram os dois fenótipos indiscriminadamente, sem ter repercussões na performance nem no tamanho dos adultos associadas ao consumo do fenótipo roxo. Assim, demonstramos que o fenótipo roxo de *P. suberosa* representa um mecanismo de escape à herbivoria para ambos os heliconíneos, sendo aqui proposto como um novo registro quanto às defesas apresentadas por passifloráceas contra seus herbívoros.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

A planta hospedeira - Passifloraceae

Passifloraceae tem ocorrência em algumas áreas da África, Américas e Ásia, tendo sua maior diversidade na região neotropical (Killip 1938; Cervi 1997). No Brasil, ocorrem cinco gêneros representados por 120 espécies das 600 descritas (Souza & Lorenzi 2008). São principalmente plantas herbáceas ou cipós, que se elevam com o auxílio de gavinhas. As folhas são alternas espiraladas, simples ou raramente compostas, freqüentemente lobadas; em geral, com nectários extraflorais no pecíolo ou lâmina, margem inteira ou serrada; e, usualmente, trinervadas (Sacco 1962; Souza & Lorenzi 2008). As passifloráceas possuem uma grande variabilidade foliar e a presença de uma corona filamentosa, com um perianto diversamente orientado e desenvolvido nas flores.

O gênero *Passiflora* Linnaeus

O gênero *Passiflora* L. é o mais representativo de Passifloraceae, possuindo 525 espécies. Caracteriza-se pela organização dos órgãos sexuais em um androginóforo, cinco estames e corona filamentosa; o gênero tem a maior variabilidade foliar encontrada dentre as angiospermas, com flores muito variáveis em tamanho e cor, com a corona e perianto

diversamente desenvolvidos, sugerindo ser resultado de um processo de evolução paralela com agentes polinizadores (Ulmer & MacDougal 2004).

Para o Estado do Rio Grande do Sul (RS), há o registro de 16 espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae), sendo 15 de ocorrência natural: *Passiflora actinia* Hook., *P. amethystina* J. C. Mikan, *P. caerulea* L., *P. capsularis* L., *P. edulis* Sims, *P. eichleriana* Mast., *P. elegans* Mast., *P. foetida* L. var. *nigelliflora* (Hook.) Mast., *P. misera* Kunth, *P. morifolia* Mast., *P. organensis* Gardner, *P. suberosa* L. ssp. *litoralis* (Kunth) Porter-Utley, *P. tenuifila* Killip, *P. urnifolia*, Rusby e *P. urubiciensis* Cervi e uma (*P. alata* Curtis) de forma subespontânea (Mondin *et al.* 2011).

***Passiflora suberosa* Linnaeus**

Passiflora suberosa é encontrada desde os Estados Unidos (Florida e Texas) até o sul do Brasil, com exceção das Guianas e Cordilheira Andina (Killip 1938; Rambo 1951, 1954; Mondin *et al.* 2011). Caracteriza-se por possuir flores pequenas com pétalas ausentes, folhas simples, trinervadas, algumas vezes com margens foliares inteiras (Sacco 1962) e com polimorfismo, muitas vezes no mesmo ramo. São plantas glabras a densamente pubescentes, com estípulas muito variáveis, desde setáceas ou lineares, até amplamente ovaladas. Possuem pecíolos biglandulares e glândulas curtas, situadas no meio do pecíolo (Cervi 1997; Mondin *et al.* 2011).

Passiflora suberosa apresenta dois morfotipos quanto à cor da folha, denominados por Barp *et al.* (2006) como fenótipos “verde” e “roxo” que se devem às variações na exposição à luz solar. Plantas de áreas abertas e bem iluminadas apresentam ramos menores, folhas de coloração roxa, menor área foliar e maior quantidade de tricomas

quando comparadas com plantas do fenótipo verde, que ocorrem em áreas sombreadas (Barp 2006).

Associado à plasticidade fenotípica, a variação no conteúdo nutricional das folhas tem sido registrada por outros autores em diversas espécies de plantas (Mattson 1980; Jurik *et al.* 1982). A forma roxa é resultado da ativação da síntese de antocianinas e derivados fenólicos (Skaltsa *et al.* 1994) como uma resposta fisiológica ao estresse luminoso (Barp *et al.* 2006), logo consta como uma adaptação ao entorno (Mclaren & Smith 1978; Fetcher *et al.* 1987; Ackerly 1997; Sultan 2003), e não uma resposta genotípica como proposto por Finkler *et al.* (1996). As antocianinas são encontradas em folhas e flores de angiospermas e atuam na fotoproteção (Gould *et al.* 1995; Lee & Collins 2001; Lee & Gould 2002; Steyn *et al.* 2002). Antocianinas somente são detectadas nas folhas roxas de *P. suberosa* (Barp *et al.* 2006), as quais incrementam a reflectância da luz e previnem a excessiva evapotranspiração (Ehleringer & Mooney 1978). Da mesma forma, em alta intensidade luminosa esta mudança é combinada com uma epiderme grossa e um esclerênquima caracterizado pelo periciclo lignificado (Barp *et al.* 2006).

Subfamília Heliconiinae

A subfamília Heliconiinae (Lepidoptera: Nymphalidae) é constituída por quatro tribos: Acraeini, Argynnini, Heliconiini e Vagrantini; as três primeiras estão representadas no RS (Teston *et al.* 2006), e a última está ausente em toda a região Neotropical (Penz & Peggie 2003; Lamas 2004). Heliconiini neotropicais se distribuem do sul dos Estados Unidos até o Uruguai (Devries 1987). Atualmente, o grupo possui cerca de 70 espécies, distribuídas em 10 gêneros (Brown 1981; Penz 1999; Lamas 2004), das quais 12 ocorrem no RS (Dell'erba *et al.* 2005; Teston *et al.* 2006).

Popularmente chamadas de borboletas-do-maracujá, a tribo Heliconiini constitui-se em um dos grupos de ninfalídeos mais conhecidos (Beltran *et al.* 2007), que devido a sua coloração aposemática no estágio adulto, impalatabilidade, participação em anéis miméticos e estreita interação com maracujazeiros (Passifloraceae), têm sido objeto de diversos estudos de cunho ecológico-evolutivo (e.g., Gilbert 1971, 1975; Benson *et al.* 1976; Spencer 1988; Mugrabi-Oliveira & Moreira 1996a, b; Jorge *et al.* 2011), dentre outros aspectos, tais como biogeografia e comportamento (e.g., Crane 1957; Benson *et al.* 1976; Brown 1981; Gilbert 1991; Rodrigues e Moreira 2002, 2004; Kerpel & Moreira 2005; Barp *et al.* 2010).

Heliconiini e *Passiflora*

Os heliconíneos estão entre os poucos grupos de insetos que conseguem utilizar as passifloráceas como fonte de alimento a pesar das defesas químicas e físicas que estas plantas apresentam, tais como a produção de compostos tóxicos secundários, presença de ovos miméticos e nectários extraflorais atrativos para formigas, dentre outras adaptações associadas à resistência a herbivoria (Benson 1978; Brown 1981; Gilbert 1991). Diante deste conflito, os heliconíneos desenvolveram capacidades para superar ou minimizar estas defesas, como a visão desenvolvida para reconhecer e escolher as plantas hospedeiras (Gilbert 1975) e o local de oviposição, bem como de discriminar a relação do tamanho dos ramos e a dureza foliar (Mugrabi-Oliveira & Moreira 1996a), dentre outras características da hospedeira.

Benson *et al.* (1976) propôs um sistema de evolução paralela resultante da pressão da herbivoria das larvas dos heliconíneos sobre as diferentes espécies de passifloráceas, onde as espécies consideradas ancestrais dentro dos heliconíneos estariam associadas a

subgêneros mais ancestrais de passifloráceas, e da mesma forma para as mais derivadas. Porém esta proposta não foi avaliada diante dos avanços alcançados recentemente a cerca da filogenia dos heliconíneos (por exemplo Beltrán *et al.* 2007), bem como das passifloráceas hospedeiras (por exemplo, Muschner *et al.* 2005).

Das 15 espécies do gênero *Passiflora* que ocorrem no RS, dez são registradas como hospedeiras de Heliconiini (Menna-Barreto & Araújo 1985; Dell'Erba *et al.* 2005). No RS, das registradas três espécies de borboletas deste grupo que utilizam *P. suberosa* para oviposição: *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775), *Dryas iulia alcionea* (Cramer, 1779) e *Agraulis vanillae maculosa* (Stichel, [1908]) (Dell'Erba *et al.* 2005; Mega & Araújo 2008). Devido principalmente à ampla distribuição geográfica e abundância, *P. suberosa* é a espécie mais utilizada por *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* no RS (Périco & Araújo 1991; Barp 2006; Mega e Araújo 2008), embora não seja usada preferencialmente em termos de escolha larval pela primeira, quando testadas frente às hospedeiras registradas na literatura (Rodrigues & Moreira 1999, 2002; Kerpel & Moreira 2005).

Heliconius erato phyllis* e *Dryas iulia alcionea

Heliconius erato phyllis e *D. iulia alcionea* são heliconíneos comuns na América do Sul (Périco & Araújo 1991). Distribuem-se por todo o Brasil, excetuando-se a região amazônica (Brown & Mielke 1972). Utilizam praticamente as mesmas plantas hospedeiras, mas *D. iulia alcionea* oviposita preferencialmente nas folhas mais velhas, enquanto fêmeas de *H. erato phyllis* preferem utilizar folhas mais novas, brotos e gavinhas, com larvas restritas a esse tipo de tecidos (Gilbert 1975; Périco 1995). Borges (2005) em testes feitos com larvas de *D. iulia alcionea* criadas em *P. suberosa* encontrou, porém que, todos os instares dessa espécie preferiram se alimentar de folhas jovens, e o consumo de folhas

maduras não influenciou negativamente sua performance. A autora sugeriu então que o uso de folhas velhas pelas larvas de *D. iulia alcionea* deve-se provavelmente a uma partilha espacial das mesmas com larvas de *H. erato phyllis*, as quais, como citado anteriormente, dependem das estruturas apicais dos ramos (Rodrigues & Moreira 1999).

Observações preliminares sugerem que o fenótipo roxo de *P. suberosa* não é muito usado pelos heliconíneos em campo. Então, já que é reconhecido que de uma maneira geral as fêmeas dos insetos selecionam as plantas ou partes das mesmas que conferem maior performance a suas proles (Papaj & Lewis 1993) e que diversas espécies de borboletas podem discriminar cores e formas quando forrageiam (Crane 1955; Rausher 1978; Traynier 1986; Weiss 1995; Kelber 1999; Weiss & Papaj 2003), poderia ser que os ramos roxos de *P. suberosa* estejam sinalizando a presença de características indesejáveis para o desenvolvimento dos hóspedes comumente encontrados no fenótipo verde, o que precisa ser explorado.

A preferência inata dos adultos de lepidóptera por cores, relacionado ao recurso alimentar floral (néctar e pólen) tem sido utilizada para demonstrar que muitos lepidópteros têm a capacidade de discriminar cores (Kelber & Pfaff 1997; Kinoshita *et al.* 1999; Barp *et al.* 2010). Em relação à oviposição, alguns estudos mostram a associação entre a forma e a cor das folhas com o número de ovos depositados em lepidóptera (Rausher 1978; Traynier 1986; Roessingh & Stadler 1990), auxiliando o encontro das plantas hospedeiras que estes insetos consideram mais adequadas. Barp (2006) em testes preliminares quanto à oviposição de fêmeas de *H. erato phyllis* em *P. suberosa*, utilizando ramos com folhas artificiais da cor verde e roxa encontrou que o número de ovos depositados pelas fêmeas foi significativamente maior em ramos da cor verde do que nos roxo. Assim, a preferência de

oviposição de *H. erato phyllis* pela forma verde de *P. suberosa* relaciona-se supostamente com a discriminação das cores roxa e verde, o que precisa ser melhor explorado.

Nesse estudo, avaliamos primeiramente (Capítulo 2) o comportamento de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* frente aos fenótipos verde e roxo de *P. suberosa*, mediante a avaliação da oviposição das fêmeas e escolha e performance larval. Espera-se uma maior flexibilidade enquanto à aceitação do fenótipo roxo por parte de *D. iulia alcionea* quando comparada a *H. erato phyllis* devido à alta plasticidade de exploração do hospedeiro por parte da última espécie de heliconíneo. Justifica-se o uso dessas duas espécies para serem estudadas devido à possível existência de partilha entre estas quanto ao fenótipo verde de *P. suberosa*, o que poderia indiretamente, dependendo da intensidade de ataque às plantas do fenótipo roxo, contrabalançar o escape à herbivoria. Neste contexto, explora-se também, de forma preliminar, em condições de laboratório, a existência de indícios de exclusão competitiva passada por interferência entre as espécies em ramos de *P. suberosa* no fenótipo verde (Capítulo 3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerly D (1997) Allocation, leaf display, and growth in fluctuating light environments. In: Bazzaz F & Grace J (eds) Plant resource allocation. Academic Press, London, pp 231-264
- Barp E A (2006) Ecologia comportamental de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae) frente a variação espaço – temporal dos recursos florais. PhD dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 128p
- Barp EA, Soares GLG, Gosmann G, Machado AM, Vecchi C, Moreira GRP (2006) Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): Induction and

- reversion of two morphs by variation in light intensity. *Brazilian Journal of Biology* 66 (3): 853-862
- Barp EA, Soares GLG, Giani EJM, Rodrigues D, Moreira GRP (2010) Variation in nectar and pollen availability, sucrose preference, and daily response in the use of flowers by *Heliconius erato phyllis*. *Journal of Insect Behavior* 24(3): 200-219
- Beltrán M, Jiggins CD, Brower AVZ, Bermingham E, Mallet J (2007) Do pollen feeding, pupal-mating and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 221-239
- Benson WW (1978) Resource partitioning in passion on vine butterflies. *Evolution* 32: 493-518
- Benson WW, Brown KS Jr., Gilbert LE (1976) Coevolution of plants and herbivores: passion flowers butterflies. *Evolution* 29: 659-680
- Borges SS (2005) Padrão natural, preferência alimentar e performance das larvas de *Dryas iulia alcionea* (Lep: Nymphalidae) em relação a idade da folha de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre 33p.
- Brown KS Jr. (1981) The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual Review of Entomology* 26: 427-456
- Brown KS Jr, Mielke OHH (1972) The heliconians of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe. *Zoologica* 57: 1-40
- Cervi AC (1997) Passifloraceae do Brasil: estudo do genero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *FontQuerria* 45: 1-92

- Crane J (1955) Imaginal behavior of a Trinidad butterfly, *Heliconius erato hydara* Hewitson, with especial reference to the social use color. *Zoologica* 40: 167-196
- Crane J (1957) Imaginal behavior in butterflies of the family Heliconiinae: changing social patterns and irrelevant actions. *Zoologica* 42: 135-145
- Dell'erba R, Kaminski LA, Moreira GRP (2005) O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia* 95: 29-46
- Devries PJ (1987) The butterflies of Costa Rica and their natural history. Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae. Princeton University Press, Princeton. 327p
- Ehleringer JR, Mooney HA (1978) Leaf hairs: effects on physiological activity and adaptative value to a desert shrub. *Oecologia* 37: 183-200
- Fetcher N, Oberbauer SF, Rojas G, Strain BR (1987) Efectos del régimen de luz sobre la fotosíntesis y el crecimiento em plantulas de arboles de un bosque lluvioso tropical de Costa Rica. *Revista Biología Tropical* 35: 97-110
- Finkler C, Freitas LB, Bonato SL, Salzano FM (1996) Caracterização molecular de duas formas morfológicas de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). *Brazilian Journal of Genetics* 19: 282.
- Gilbert LE (1971) Butterfly-plant coevolution: has *Passiflora adenopoda* won the selectional race with Heliconiini butterflies? *Science* 172: 585-586
- Gilbert LE (1991) Biodiversity of a central American *Heliconius* community: pattern, process, and problems. In: Price PW, Lewinsohn TM, Fernandes GW, Benson WW (eds) *Plant animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions*. John Wiley & Sons, New York, pp 403-427

- Gilbert LE (1975) Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In: Gilbert LE, Raven PH (eds) *Coevolution of animals and plants*. University of Texas Press, Austin, pp 210-240
- Gould KS, Kuhn DN, Lee DW, Oberbauer SF (1995) Why leaves are sometimes red. *Nature* 378: 241-242
- Jorge LR, Cordeiro-Estrela P, Klaczko LB, Moreira GRP, Freitas AVL (2011) Host-plant dependent wing phenotypic variation in the neotropical butterfly *Heliconius erato*. *Biological Journal of the Linnean Society* 102: 765–774
- Jurik TW, Chabot FJ, Chabot B (1982) Effects of light and nutrients on leaf size, CO₂ exchange, and anatomy in wild strawberry (*Fragaria virginiana*). *Plant Physiology* 70: 1044-1048
- Kelber A (1999) Ovipositing butterfly use a red receptor to see green. *Journal of Experimental Biology* 202: 2619-2630
- Kelber A, Pfaff M (1997) Spontaneous and learned preference for visual flower features in a diurnal hawkmoth. *Israel Journal of Plant Sciences* 45: 235-245
- Kerpel SM, Moreira GRP (2005) Absence of learning and local specialization on host plant selection by *Heliconius erato*. *Journal of Insect Behavior* 18: 433-452
- Killip EP (1938) *The American Species of Passifloraceae*. Museum of Natural History, Botanical Series, New York, 613p
- Kinoshita M, Shimada N, Arikawa K (1999) Colour vision of the foraging swallowtail butterfly *Papilio xuthus*. *Journal of Experimental Biology* 202: 95-102
- Lamas G (2004) Checklist: Part 4A. Hesperioidea - Papilionoidea. In: J.B. Heppner (ed) *Atlas of Neotropical Lepidoptera*. Vol. 5A. Association for Tropical Lepidoptera, Scientific Publishers, Gainesville, 428p

- Lee D, Collins TM (2001) Phylogenetic and ontogenic influences of the distribution of anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants. *International Journal of Plant Sciences* 162: 1141-1153
- Lee D, Gould KS (2002) Why leaves turn red. *American Scientist* 90: 524-531
- Mattson Jr WJ (1980) Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Annual Review of Ecological and Systematic* 11: 119-161
- Mclaren JS, Smith H (1978) Phytochrome control of the growth and development of *Rumex obtusifolius* under simulated canopy light environments. *Plant, Cell & Environment* 1: 61-67
- Mega NO, Araújo A (2008) Do caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae) show evidence of adaptive behaviour to avoid predation by ants? *Journal of Natural History* 42: 129–137
- Menna-Barreto Y, Araujo AM (1985) Evidence for host plant preferences in *Heliconius erato phyllis* from southern Brazil (Nymphalidae). *Journal of Research on Lepidoptera* 24: 41-46
- Mondin CA, Cervi AC, Moreira GRP (2011) Sinopse das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Brazilian Journal of Biosciences* (9): 3-27
- Mugrabi-Oliveira E, Moreira GRP (1996a) Conspecific mimics and low host plant availability reduce egg laying by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 13: 929-937
- Mugrabi-Oliveira E, Moreira GRP (1996b) Size of and damage on shoots of *Passiflora suberosa* (Passifloraceae) influence oviposition site selection of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 13: 939-953

- Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Vecchia M, Bonatto SL, Salzano FM, Freitas LB (2005) Differential organellar inheritance in *Passiflora*'s (Passifloraceae) subgenera. *Genetica* 128: 449-453
- Papaj DR, Lewis A (1993) *Insects learning: ecological and evolutionary perspectives*. New York, Chapman & Hall 398p
- Penz CM (1999) Higher level phylogeny for passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society* 127: 277-344
- Penz CM, Peggie D (2003) Phylogenetic relationships among Heliconiinae genera based on morphology (Lepidoptera: Nymphalidae). *Systematic Entomology* 28: 451-479
- Périco E (1995) Interação entre quatro espécies de Heliconiinae (Lepidoptera: Nymphalidae) e suas plantas hospedeiras (Passifloraceae) em uma floresta secundária do Rio Grande de Sul, Brasil. *Biociências* 3: 3-18
- Périco E, Araujo AM (1991) Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolución Biológica* 5: 59-74
- Rambo B (1954) Análise histórica da flora de Porto Alegre. *Sellowia* 6: 9-112
- Rambo B (1951) A migração da selva higrófila do Rio Grande do Sul. *Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues* 3: 89-91
- Rausher M (1978) Search image for leaf shape in a butterfly. *Science* 200: 1071-1073
- Rodrigues D, Moreira GRP (1999) Feeding preference of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) in relation to leaf and consequences for larval performance. *Journal of the Lepidopterists Society* 53: 108-113

- Rodrigues D, Moreira GRP (2002) Geographical variation in larval host plant used by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Brazilian Journal of Biology* 62: 321-332
- Rodrigues D, Moreira GRP (2004) Seasonal variation in larval host-plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) adult body size. *Austral Ecology* 29: 437-445
- Roessingh P, Stadler E (1990) Foliar form, colour and surface characteristics influence oviposition behavior in the cabbage root fly *Delia radicum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 57: 93-100
- Sacco JC (1962) Flora ilustrada do Rio Grande do Sul – Passifloraceae. *Boletín del Instituto de Ciencias Naturales* 12: 7-29
- Skaltsa H, Verykokidou E, Harvala C, Karabourniotis G, Manetas Y (1994) UV-Protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. *Phytochemistry* 37: 987-990
- Souza CV, Lorenzi H (2008) *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2d.ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa 704p
- Spencer KC (1988) Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction. In: Spencer KC (eds) *Chemical mediation of coevolution*. Academic Press, New York, pp167-239
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155: 349-361
- Sultan E (2003) Phenotypic plasticity: a case study in ecological development. *Evolution e Development* 5: 25-33

- Teston JA, Toledo KG, Corseuil E (2006) Ninfalídeos (Lepidoptera, Nymphalidae) ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. Parte III. Heliconiinae e Libytheinae, *Biociências* 14: 208-213
- Traynier RMM (1986) Visual learning in assays of sinigrin as oviposition releaser for the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 40: 25-33
- Ulmer T, MacDougal JM (2004) *Passiflora* passion flowers of the world. Portland: Timber Press, 2004. 430p.
- Weiss W (1995) Associative color learning in a nymphalid butterfly. *Ecological Entomology* 20: 298-301
- Weiss M, Papaj DR (2003) Color learning in two behavioral contexts: How much can a butterfly keep in mind? *Animal Behavior* 65: 425-434

CAPITULO 2

Plasticidade fenotípica nas folhas de *Passiflora suberosa* Linnaeus e conseqüências na herbivoria por duas espécies de heliconíneos (Lepidoptera: Nymphalidae)

Artigo a ser submetido para Oecologia

RESUMO

A plasticidade fenotípica é reconhecida como as mudanças plásticas reversíveis de um indivíduo frente ambientes flutuantes; esta poder ser entendida como uma modificação causada por condições as vezes adversas, como por exemplo, diminuição no ritmo metabólico ou como um ajustamento do individuo às novas e atuais condições. *P. suberosa* Linnaeus apresenta dois morfotipos denominados “verde” e “roxo”, onde o roxo é resultado da ativação da síntese de antocianinas e derivados fenólicos, como resposta fenotípica à acentuada incidência de luz solar. O fenótipo roxo apresenta, dentre outras características, um incremento na dureza foliar, que poderiam afetar os padrões de uso de *P. suberosa* por parte dos heliconíneos *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) e *Dryas iulia alcionea* (Cramer, 1779), seus principais herbívoros. Mediante testes de oviposição e preferência e performance das larvas dessas espécies, encontramos que *D. iulia alcionea* apresentou uma maior flexibilidade quanto à aceitação do fenótipo roxo, evidenciada na inexistência de escolha por um ou outro fenótipo por parte das larvas de primeiro instar, e uma sobrevivência e tamanho de adultos similar nos dois fenótipos quando comparados com *H. erato phyllis*, espécie que rejeitou totalmente o fenótipo roxo durante o primeiro instar e apresentou uma sobrevivência e tamanho de adultos significativamente menores do que os obtidos na criação no fenótipo verde. Os nossos resultados sugerem que o fenótipo roxo prejudica o desenvolvimento de *H. erato phyllis* enquanto que poderia representar um recurso viável para *D. iulia alcionea*. A ultima espécie é altamente plástica enquanto ao consumo de folhas velhas e novas do hospedeiro, pelo que sugerimos então que é a dureza das folhas do fenótipo roxo o que impossibilita o aproveitamento do mesmo por parte de *H. erato phyllis*.

Palavras chave: Plasticidade fenotípica, herbivoria, seleção da planta hospedeira, performance.

INTRODUÇÃO

Uma das abordagens da plasticidade fenotípica em animais e plantas define-a como um grupo de expressões fenotípicas ambiente-dependentes as quais obedecem na maioria dos casos a um ajustamento do indivíduo ao seu entorno (Bradshaw 1965; Schlichting 1986; Travis 1994; Sultan 1995, 2000, 2003; Pigliucci 2002; West-Eberhard 2003; DeWitt & Scheiner 2004). *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae) é uma espécie de maracujá que ocorre tipicamente em ambientes sombreados, porém, existem populações em ambientes abertos. Neste caso, onde há maior incidência de luz solar, as folhas apresentam, dentre outras características, coloração roxa resultado da síntese de antocianinas e derivados fenólicos (Barp *et al.* 2006) que incrementam a reflectância da luz e previnem a excessiva evapotranspiração (Ehleringer & Mooney 1978; Skaltsa *et al.* 1994); sendo um processo reversível associado a uma resposta fenotípica (Barp *et al.* 2006) e não a uma mudança genotípica como proposto por Finkler *et al.* (1996).

O uso da visão ao reconhecimento do recurso alimentar floral e da planta hospedeira por parte insetos herbívoros tem sido amplamente registrado na literatura (Ehrlich & Raven 1964; Gilbert 1975; Benson 1978; Menna-Barreto & Araujo 1985; Thompson & Pellmyr 1991; Barp 2006). A escolha do local de oviposição correspondente por parte da fêmea está usualmente associada com uma otimização do desempenho da sua prole (Breedlove & Ehrlich 1968; Singer 1971; Badawi *et al.* 1976; Rathcke 1976; Jones 1991; Bernays & Chapman 1994; Weiss & Papaj 2003).

Uma alta especialização para reconhecimento dos hospedeiros por parte dos insetos poderia ocasionar que modificações fenotípicas como tamanho e fenologia das plantas hospedeiras terminem por influenciar os padrões de uso que esses insetos fazem das mesmas na natureza (Heinrich 1971; Bryant & Raske 1975; Gilbert & Singer 1975; Kidd 1976; Thompson & Price 1977).

Borboletas Heliconinae (Lepidoptera: Nymphalidae) são reconhecidas principalmente pela estreita relação com plantas da família Passifloraceae, sendo proposto por alguns autores como uma evolução paralela na qual as plantas adotaram estratégias para responder às pressões de herbivoria exercidas pelos heliconíneos. Dentre essas adaptações reconhecem-se, por exemplo, a modificação da forma foliar à qual os heliconíneos pareceram responder com uma visão altamente desenvolvida (Gilbert 1975; Benson *et al.* 1976, 1978). Observações preliminares de campo sugerem que os ramos roxos de *P. suberosa* exibem menores índices de danos associados à herbivoria, e então esse fenótipo poderia estar exibindo características indesejáveis para as fêmeas de heliconíneos que utilizam essa espécie como hospedeira. Tal aspecto poderia ser considerado um mecanismo de escape à herbivoria, o que resta a ser testado.

Passiflora suberosa é atacada principalmente por *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea*, duas espécies de heliconíneos comuns na América do Sul, que ocorrem em simpatria no Estado do Rio Grande do Sul (RS) (Perico & Araujo 1991). Porém, embora utilizem praticamente as mesmas plantas hospedeiras (Dell'Erba *et al.* 2005, Mega & Araújo 2008) ocorre uma utilização diferencial deste recurso. As fêmeas de *H. erato phyllis* preferem ovipositar nas folhas mais jovens, brotos e gavinhas (Périco 1995), sendo demonstrado por Rodrigues e Moreira (1999) que a sobrevivência exitosa da prole ocorre quando larvas consomem essas partes do hospedeiro. As fêmeas de *D. iulia alcionea*, no

entanto, utilizam tanto folhas jovens e maduras deste hospedeiro, inclusive substratos adjacentes para oviposição, e as larvas são capazes de consumir esse tipo de tecido desde o primeiro instar, sem influenciar negativamente performance e sobrevivência (Borges 2005).

No presente estudo, avaliamos a oviposição, a preferência alimentar e o desempenho exibido pelas larvas de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* submetidas a plantas dos fenótipos verde e roxo de *P. suberosa*, com vistas a elucidar os mecanismos envolvidos no uso diferencial de plantas de ambos os fenótipos acima por parte dessas espécies de heliconíneos. Espera-se uma maior flexibilidade enquanto à aceitação do fenótipo roxo por parte de *D. iulia alcionea* quando comparada a *H. erato phyllis* devido à alta plasticidade de exploração do hospedeiro por parte da última espécie de heliconíneo. Justifica-se o uso dessas duas espécies para serem estudadas devido à possível existência de partilha entre estas quanto ao fenótipo verde de *P. suberosa*, o que poderia indiretamente, dependendo da intensidade de ataque às plantas do fenótipo roxo, contrabalançar o escape à herbivoria.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo das plantas

Plântulas do fenótipo verde de *P. suberosa* (n = 140) coletadas na Estação Experimental de Águas Belas / FEPAGRO, município de Viamão, RS, foram transplantadas para vasos contendo terra preta comercial, inicialmente mantidos em telado de sombrite 50%, existente no Campus do Vale / UFRGS, Porto Alegre, RS. Após um período de oito meses, os vasos foram sorteados aleatoriamente de forma que 50% deles foi transferido para local aberto, completamente exposto à incidência da luz solar, para induzir nas plantas o surgimento do fenótipo roxo conforme critérios descritos em Barp *et al.*

(2006), o qual demorou aproximadamente dois meses em se manifestar. As plantas restantes permaneceram na sombra, sob telado de sombrite, com a finalidade de manter o fenótipo verde. Nos terços inicial, meio e final do cultivo, as plantas foram adubadas com esterco ovino e regadas sempre que necessário.

Testes de oviposição

Foram conduzidos testes de oviposição em ramos naturais dos dois fenótipos de *P. suberosa* procedentes dos cultivos, os quais apresentavam as cinco primeiras folhas abertas e o botão apical intacto. As cores verde e roxa usadas nos testes foram definidas conforme as cores da tabela RGB para programação informática (Copyright © 2007 Kevin J. Walsh).

As fêmeas foram coletadas com rede entomológica no Morro Santana, Porto Alegre (RS) (n 25/teste) onde os fenótipos verde e roxo têm proporções de ocorrência natural similares. Foram mantidas em insetário constituído por telado de sombrite 50% de cor preto e dividido em 10 compartimentos de 2,0 X 2,0 X 2,7 m. (Kerpel & Moreira 2005). A partir do terceiro dia após a coleta, período em que as borboletas tiveram plantas hospedeiras e alimento *ad libitum* composto de uma mistura de mel, pólen e água destilada na proporção 2:1:7 (Ferro 1998), as fêmeas foram separadas e distribuídas de forma aleatória e individualmente nos compartimentos do insetário para dar início aos testes de oviposição, os quais foram realizados das 9 às 16 horas, no período de março a maio de 2011 (Kerpel & Moreira 2005).

Levando-se em conta que os ovos de *H. erato phyllis* são depositados geralmente em plantas diferentes e de forma individual (Mugrabi-Oliveira & Moreira 1996) e que a taxa de oviposição diária é de três a cinco ovos (Dunlap-Pianka *et al.* 1979), os testes sem chance de escolha constaram de cinco ramos de um fenótipo só e os testes de escolha dupla

de cinco ramos de cada fenótipo distribuídos aleatoriamente no insetário. O método utilizado para *H. erato phyllis* foi estendido para *D. iulia alcionea* devido à ausência de restrições deste heliconíneo no referido à quantidade de ovos depositados por planta hospedeira (Dunlap-Pinka *et al.* 1979). Cada borboleta foi testada apenas uma vez e foi logo após do teste foi marcada e liberado ao ambiente.

Testes de escolha alimentar no estágio larval

Avaliou-se a escolha alimentar do primeiro e quinto instares larvais ($n = 25/\text{instar}$) para ambas as espécies de heliconíneos mediante testes de dupla escolha, usando discos foliares de área conhecida utilizando um vazador de uso comercial (Hanson 1983; Rodrigues & Moreira 1999, Silva 2008) dos fenótipos verde e roxo de *P. suberosa*. Para excluir a possibilidade de efeito relativo à indução na preferência durante o quinto instar, larvas recém-eclodidas de ambas as espécies foram criadas independentemente em ramos intatos de *P. suberosa* do fenótipo verde e do fenótipo roxo, e depois submetidas a experimentos de dupla escolha em testes recíprocos. Os restos dos discos foliares resultantes dos testes foram colados em papel para determinar a área consumida (Rodrigues & Moreira 1999; Borges 2005; Silva 2008) sendo considerada “escolha” quando houve o dobro do consumo de uma forma sobre a outra e “neutro” quando isso não aconteceu, conforme Thomas (1987) e modificado por Rodrigues e Moreira (1999) e Silva (2008).

A quantidade de discos oferecida para as larvas de primeiro e quinto instar foi o dobro do consumo médio estimado para as espécies, considerando o período de duração do teste (cinco horas), determinado por Rodrigues & Moreira (1999), para assim evitar que a falta de um fenótipo ocasionasse o uso do outro. Folhas apicais, correspondentes aos nós de um a cinco (jovens) foram utilizadas para a confecção dos discos oferecidos para as larvas

de primeiro instar das duas espécies. Aquelas correspondentes aos nós de número seis a dez (velhas) foram utilizadas para a obtenção dos discos oferecidos às larvas de quinto instar. Tal procedimento foi adotado no sentido de reproduzir os padrões alimentares de folhas jovens e velhas exibidos por *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* quando alimentadas com *P. suberosa*, obtidos respectivamente por Rodrigues & Moreira (1999) e Borges (2005). Cada larva foi testada apenas uma vez; após o teste as larvas foram criadas e liberadas como adultos no meio natural.

Performance larval

Os ovos usados nos experimentos foram obtidos de uma criação mantida em insetário, localizado nas dependências do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS). Os adultos foram criados com uma dieta seminatural de mistura de mel, pólen e água destilada, disposta em recipientes plásticos segundo o descrito por Ferro (1998). Após a eclosão, as larvas (n=25) foram transferidas para ramos de *P. suberosa* dos fenótipos verde e roxo, dispostos em garrafas plásticas contendo água, providas de armação de arame e bambú para ancoramento dos ramos e mantidas em câmara climatizada ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 14 horas/luz/dia). As larvas foram observadas diariamente para a reposição de alimento, o qual foi oferecido *ad libitum*, quantificação da sobrevivência, duração do tempo de desenvolvimento. Após a emergência, os adultos foram medidos quanto ao comprimento da asa anterior com ajuda de um parquímetro manual.

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade de variância pelos testes de Shapiro-Wilk's W e de Barlett, respectivamente. Devido a não normalidade

destes, os resultados da performance de ambas as espécies foram comparados por meio de testes não paramétricos de Mann-Whitney e, a sobrevivência, analisada mediante testes não paramétricos de Log-rank. Os dados relativos ao comprimento das asas anteriores, os quais mostraram uma distribuição normal, foram analisados por meio de testes paramétricos *t* de Student. Para tal, seguiu-se os procedimentos contidos em Snedecor & Cochran (1989) e Conover (1980), quanto a estatística paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

RESULTADOS

Oviposição

As fêmeas de *H. erato phyllis* ovipositaram significativamente mais em plantas do fenótipo verde ao roxo tanto em testes sem chance de escolha ($U=126.00$, $P=0.0003$, $n=25$) como de escolha dupla ($U=122.50$, $P=0.00023$, $n=25$) (Fig. 1). As fêmeas de *D. iulia alcionea* apresentaram um padrão de oviposição similar a *H. erato phyllis* nesses ramos tanto em testes sem chance de escolha ($U= 5.00$, $P<0.01$, $n=20$) como de escolha dupla ($U=47.00$, $P=0.000035$, $n=20$) (Fig. 2).

Preferência alimentar no estágio larval

O primeiro instar de *H. erato phyllis* alimentou-se com uma maior intensidade do fenótipo verde ao roxo enquanto que larvas desse instar de *D. iulia alcionea* se alimentaram dos dois fenótipos indistintamente. Larvas de quinto instar de ambas as espécies alimentaram-se significativamente mais de folhas do fenótipo verde (Tabela 1).

Performance larval

Sobrevivência

A sobrevivência de *H. erato phyllis* no fenótipo roxo de *P. suberosa* apresentou diferenças significativas quando comparada com a verde (teste Log-rank, $P=0.009$, $n=25$) enquanto a sobrevivência de *D. iulia alcionea* não apresentou diferenças entre os dois fenótipos da planta (teste Log-rank, $P=0.31$, $n=24$) (Fig. 3).

Desenvolvimento larval e tamanho dos adultos

O desenvolvimento desde eclosão da larva à emergência do adulto de *H. erato phyllis* criadas no fenótipo verde e roxo de *P. suberosa* não apresentou diferenças significativas ($U=123.00$, $P=0.14$, $n=25$) (Fig. 4A) enquanto para *D. iulia alcionea* as diferenças foram significativas ($U=170.00$, $P=0.024$, $n=24$) (Fig. 4B).

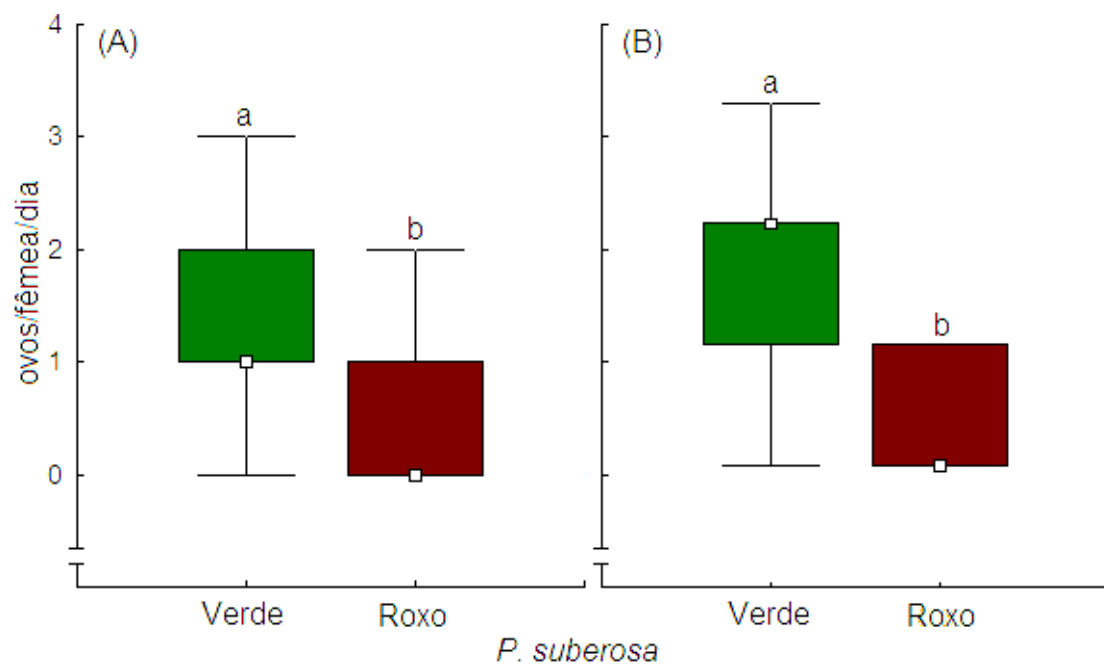


Fig. 1 Intensidade de oviposição de *H. erato phyllis* em ramos naturais dos dois fenótipos de *P. suberosa* em testes (A) sem chance de escolha e (B) escolha dupla. Em cada gráfico boxplots com letras distintas diferem estatisticamente e os quadrados internos representando as medianas e respectivos quartis (teste de Mann-Whitney, alfa = 0.05).

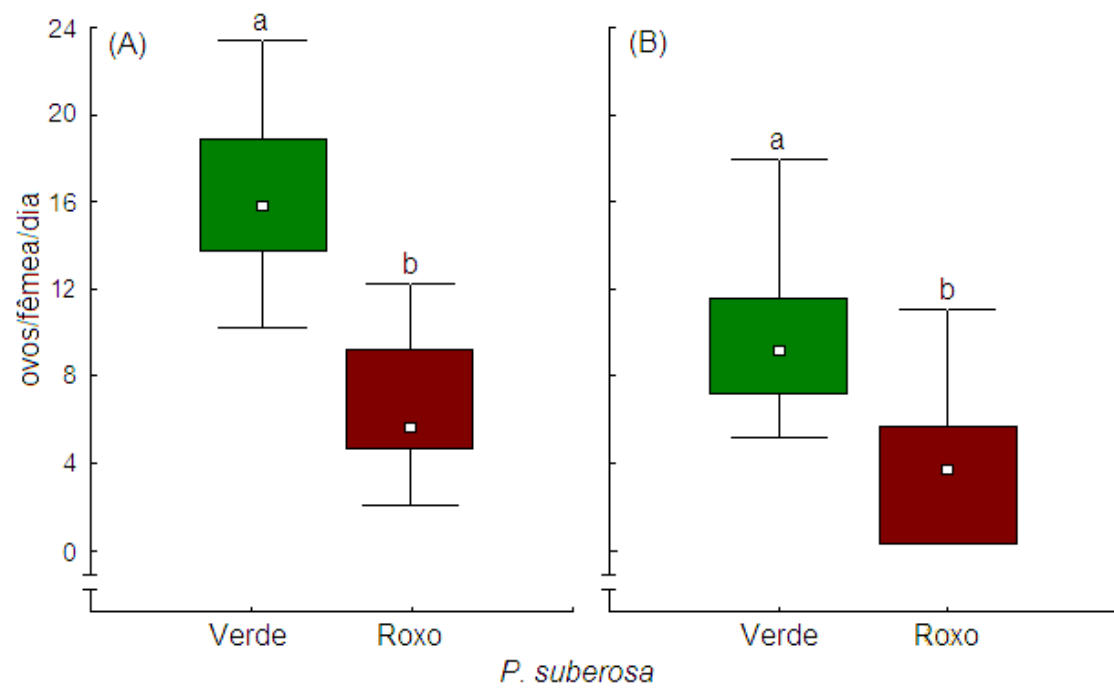


Fig. 2 Intensidade de oviposição de *D. iulia alcionea* em ramos naturais dos dois fenótipos de *P. suberosa* em testes (A) sem chance de escolha e (B) escolha dupla. Em cada gráfico boxplots com letras distintas diferem estatisticamente e os quadrados internos representando as medianas e respectivos quartis (teste de Mann-Whitney, alfa = 0.05).

Tabela 1 Seleção das larvas de primeiro (L1) e quinto (L5) instar de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* em testes de dupla escolha em relação aos fenótipos verde e roxo de *P. suberosa*. A coluna “Instar/cor” refere-se ao instar testado e a cor da planta na que as larvas foram criadas até quinto instar. Os números representam o numero de larvas que escolheram o fenótipo verde, o fenótipo roxo, sendo “neutro” os casos onde o consumo não foi em dobro de uma cor em relação à outra. Astesisco denota diferenças significativas (teste não paramétrico dos Sinais, alfa= 0.05)

Espécie	Instar/cor	Categorias adotadas no teste de escolha			Total
		Verde	Neutro	Roxo	
<i>H. erato</i>					
	L1	22*			22
	L5/V	15*	1	4	20
	L5/R	13*	1	1	15
<i>D. iulia</i>					
	L1	11	4	4	19
	L5/V	13*	6	5	24
	L5/R	16*	2	4	22

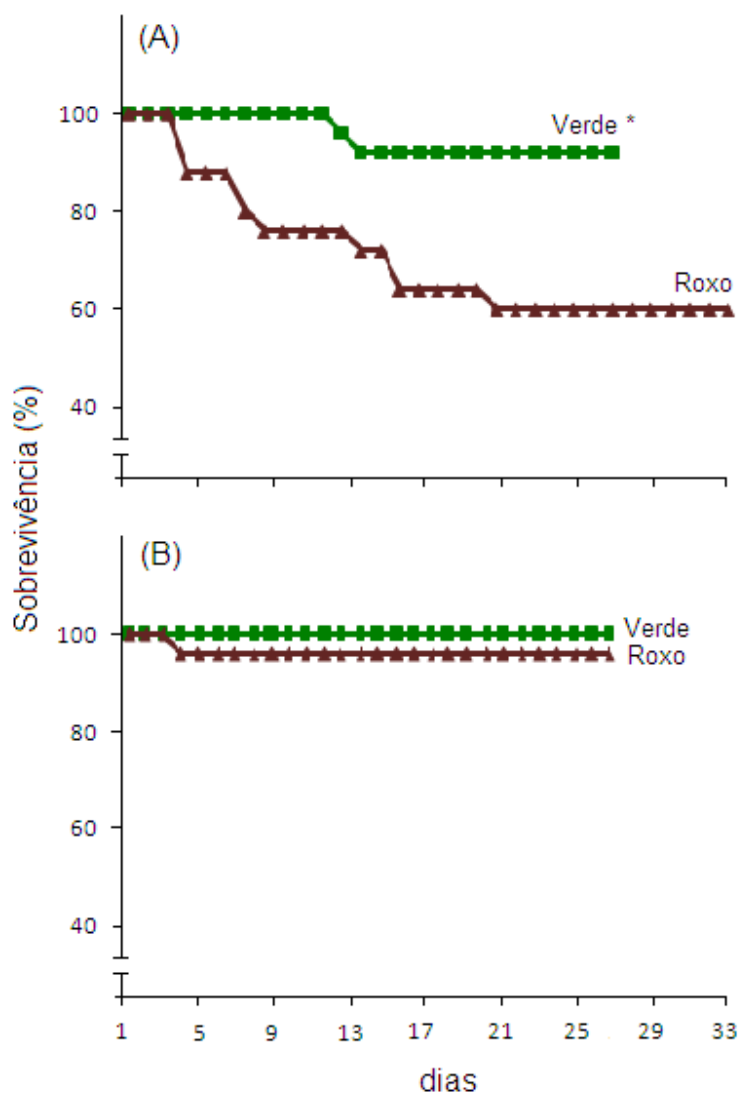


Fig. 3 Sobrevivência até a emergência da pupa de (A) *H. erato phyllis* e (B) *D. iulia alcionea* nos fenótipos de *P. suberosa*. Para cada espécie de heliconíneo, o asterisco indica diferenças significativas (testes Log-rank, alfa=0.05)

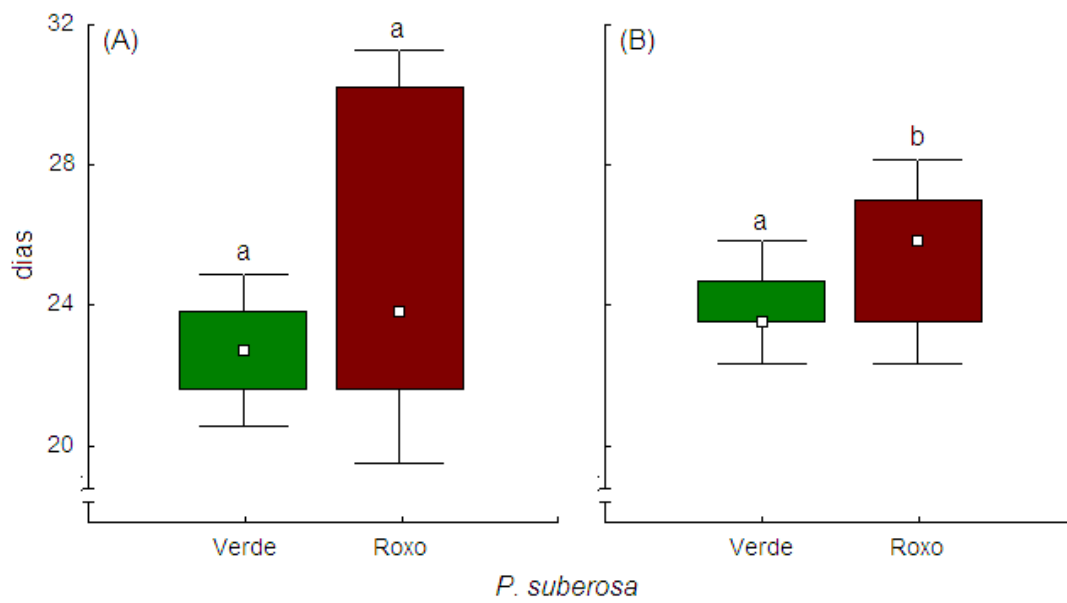


Fig. 4 Tempo de desenvolvimento desde a eclosão larval até a emergência dos adultos de (A) *H. erato phyllis* e (B) *D. iulia alcionea* nos fenótipos verde e roxo de *P. suberosa*. Em cada gráfico boxplots com letras distintas diferem estatisticamente e os quadrados internos representando as medianas e respectivos quartis (teste de Mann-Whitney, alfa= 0.05)

O tamanho da asa anterior dos adultos de *H. erato phyllis* provenientes das larvas criadas no fenótipo verde diferiu significativamente das criadas no fenótipo roxo ($t=3.30$, $P=0.0022$) (Fig. 5A). O tamanho dos adultos de *D. iulia alcionea* no fenótipo verde não diferiu das dos obtidos no fenótipo roxo ($t=2.01$, $P=0.051$) (Fig. 5B).

DISCUSSÃO

Oviposição

Os resultados dos testes de oviposição mostraram claramente que as fêmeas de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* preferem ovipositar no fenótipo verde comparado ao roxo de *P. suberosa*, tanto em testes sem chance como de dupla escolha. Os dados análogos apresentados por Barp (2000), relativos ao uso de substratos artificiais em tais testes, em associação aos aqui obtidos, onde substratos naturais foram usados, comprovam que a cor da folha per se e não os componentes químicos desta, determinam diretamente tal escolha.

A visão tem uma função importante no reconhecimento do local de oviposição em insetos em geral (Papaj & Lewis 1993). Em adição, a escolha do hospedeiro por parte das fêmeas é a que determina o desempenho da prole até alcançar o estágio de pupa (Bernays & Chapman 1994; Jones 1991). Não obstante, a plasticidade fenotípica das plantas tem sido reconhecida como fator governante no comportamento de alguns insetos herbívoros, especialmente no referido tanto à oviposição (Breedlove & Ehrlich 1968; Singer 1971; Badawi *et al.* 1976, Ratcke 1976) quanto no uso de plantas hospedeiras por parte de larvas e adultos destes (Heinrich 1971; Gilbert & Singer 1975, Thompson & Price 1977).

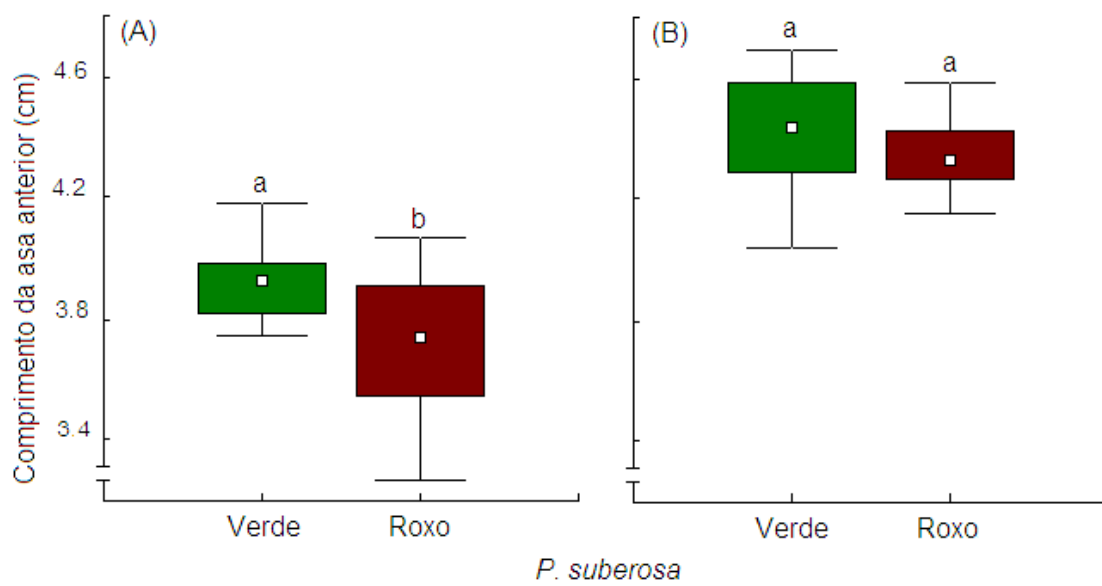


Fig. 5 Tamanho da asa de (A) *H. erato phyllis* e (B) *D. iulia alcionea* criadas nos fenótipos verde e roxo de *P. suberosa*. Em cada gráfico boxplots com letras distintas diferem estatisticamente e os quadrados internos representando as medianas e respectivos quartis (testes *t* de Student, alfa = 0.05).

A visão dos heliconíneos é bastante desenvolvida, quando comparada a outros lepidópteros (Swihart 1965, 1968, 1971; Swihart 1970; Gilbert 1975; Barp *et al.* 2010) e está associada a uma estreita seleção do local de oviposição, que leva em conta o tamanho, a qualidade e a densidade dos ramos, bem como a dureza das folhas do hospedeiro (Mugrabi-Oliveira & Moreira 1996b; Kerpel & Moreira 2005). Para outros lepidópteros, tem sido demonstrada a existência de uma associação entre a forma e a cor das folhas atuando na intensidade de oviposição, sugerindo que tal aspecto seja usado indiretamente como um indicativo da qualidade destas (Rausher 1978; Roessingh & Stadler 1990; Traynier 1986). A preferência de oviposição de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* pelo fenótipo verde sugere que o fenótipo roxo de *P. suberosa* poderia estar apresentando características indesejáveis para as fêmeas; características que não estariam presentes no fenótipo verde, o que resta a ser elucidado.

Preferência alimentar no estágio larval

Os resultados dos testes de escolha usando os dois fenótipos de *P. suberosa* mostraram que larvas de primeiro e quinto instar de *H. erato phyllis* preferiram consumir o fenótipo verde ao roxo. No caso do primeiro instar dessa espécie, a rejeição do fenótipo roxo foi total. Larvas de quinto instar de *D. iulia alcionea* mostraram preferência pelo fenótipo verde, enquanto o primeiro instar não exibiu preferência de escolha por nenhum dos fenótipos. Larvas de quinto instar de ambas as espécies criadas no fenótipo roxo de *P. suberosa* e testadas quanto à preferência alimentar em relação aos dois fenótipos não apresentaram indução à preferência já que da mesma forma do que larvas criadas desde o primeiro instar no fenótipo verde preferiram esse último quando comparado com o roxo em testes de escolha dupla. Assim, descarta-se a participação deste tipo de aprendizado no

estágio de larva (Papaj & Lewis 1993; Bernays & Chapman 1994) para explicar os resultados correspondentes, a semelhança do obtido por Kerpel & Moreira (2005).

É conhecido que a utilização de várias espécies de Passifloraceae por parte de heliconíneos permite maior forrageio, garantindo uma maior sobrevivência principalmente quando há escassez de recursos (Chew 1975; Rodrigues & Moreira 2002, 2004; Millán-Jiménez et al. 2010). A aceitação ou rejeição de hospedeiros por parte de insetos é mais restrita durante o primeiro instar, uma vez que este apresenta maior vulnerabilidade aos efeitos da planta hospedeira. Por sua vez, o quinto instar é mais plástico e, dependendo do hábito alimentar (oligófago/polífago), apresenta uma maior plasticidade para utilizar hospedeiros diferentes para completar o estágio larval (Chew 1975; Bernays 1997; Zalucki et al. 2002). O fato das larvas de primeiro instar de *H. erato phyllis* terem rejeitado o fenótipo roxo é indicio que essa espécie é altamente vulnerável ao consumo do mesmo, pelo menos durante esse instar.

Nesse respeito, as barreiras das plantas aos herbívoros podem ser de natureza mecânica e/ou química (Bernays 1991; Bernays & Chapman 1994; Coley 1980; Feeny 1976; Gilbert 1975; Scriber & Slankly 1981). Estudos de Barp et al. (2006) sobre a química dos fenótipos verde e roxo de *P. suberosa* mostraram que eles não diferem significativamente na composição de macro e micro nutrientes (cobre, zinco, ferro, manganês, sódio, boro, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre), sendo somente maior o conteúdo de antocianinas no fenótipo roxo. Levando em conta que as antocianinas são encontradas naturalmente em folhas, flores e frutos de angiospermas (Gould et al. 1995; Lee & Collins 2001; Lee & Gould 2002; Steyn et al. 2002) sendo usualmente consumidas por varias espécies animais na natureza, sem maiores restrições (Rosental & Berenbaum 1991), é de se supor que a barreira para o consumo do fenótipo

roxo por parte de larvas de primeiro instar de *H. erato phyllis* reside em componentes mecânicos presentes na planta.

Além da diferença quanto à composição química, os fenótipos verde e roxo de *P. suberosa* apresentam diferenças morfológicas que são marcantes. Além da cor diferenciada em folhas e pecíolos ocasionados pelas antocianinas, o fenótipo roxo mostra um aumento significativo na dureza e pilosidade das folhas (Barp *et al.* 2006). Levando em conta que Rodrigues e Moreira (1999) demonstraram a dependência de larvas de primeiros instares de *H. erato phyllis* à maciez do botão terminal e primeiras folhas (folhas jovens) do ramo, sugere-se que a rigidez apresentada pelo fenótipo roxo é o fator determinante impedindo a alimentação de larvas de *H. erato phyllis* durante o primeiro instar. Em apoio a tal hipótese, situa-se e a inexistência de escolha por parte de larvas de *D. iulia alcionea* de primeiro instar por um fenótipo ou outro. Ou seja, o fenótipo roxo é um recurso utilizável desde o primeiro instar larval dessa espécie.

Estudos de Silveira (2002) evidenciaram o alto grau de desgaste ocorrido nas mandíbulas de larvas de *H. erato phyllis* em relação ao aumento da idade (rigidez) das folhas oferecidas para alimentação. A autora argumenta que o desgaste deve-se ao fato que as mandíbulas de indivíduos de primeiro instar dessa espécie possuem dentes pontiagudos com a região posterior conspícua, supostamente adaptados para lidar com tecidos jovens, limitando a alimentação em tecidos duros e espessos. Em estudo complementar, Elpino-Campos (2011) demonstrou que esse fenômeno também está associado ao menor grau de rigidez das mandíbulas ao início do desenvolvimento larval, sendo então dois estudos que explicariam o aproveitamento nulo do fenótipo roxo por parte de larvas de *H. erato phyllis* de primeiro instar.

Performance larval

Do mesmo modo que Rodrigues e Moreira (1999), registrou-se uma alta mortalidade de larvas de *H. erato phyllis* associada ao consumo de folhas velhas (rígidas) de *P. suberosa*. O aumento significativo da mortalidade apresentado aqui por esse heliconíneo no fenótipo roxo quando comparado com o fenótipo verde, dá suporte à hipótese de que a dureza das folhas representa a principal barreira que dificulta o acesso ao recurso roxo pelo menos por parte de larvas jovens de *H. erato phyllis*. Por outro lado, para *D. iulia alcionea* que, apesar de apresentar uma sobrevivência similar nos dois fenótipos, também ocorre um atraso no tempo de desenvolvimento no fenótipo roxo quando comparado com a situação exibida no fenótipo verde. Tal condição pode ser considerada desvantajosa por resultar em maior tempo de exposição aos predadores (Chew 1975; Price *et al.* 1980). Então, essa última espécie consegue aproveitar exitosamente o recurso, porém com um custo mais elevado do que seria no fenótipo verde do hospedeiro.

No que tange ao tamanho dos adultos de ambas as espécies de heliconíneos, os adultos de *H. erato phyllis* obtidos da criação no fenótipo roxo foram significativamente menores, enquanto nenhuma influência no tamanho foi constatada para adultos de *D. iulia alcionea*. Uma vez que o tamanho das fêmeas dos insetos está diretamente associado com a capacidade reprodutiva das mesmas (Rodrigues & Moreira 2002, 2004; Slansky 1993), subentende-se então que o consumo do fenótipo roxo durante o desenvolvimento larval não afeta a performance dos adultos de *D. iulia alcionea*, mas sim a de *H. erato phyllis*.

O fenótipo roxo de *P. suberosa* como mecanismo secundário de defesa anti-herbívora representa um descobrimento no referente às defesas das passifloráceas frente a seus herbívoros heliconíneos. São necessários estudos de campo que avaliem a intensidade de herbivoria sofrida pelo fenótipo roxo de *P. suberosa* para constatar se esse realmente

está servindo como barreira para o acesso desses heliconíneos. Por outro lado, o uso exitoso do fenótipo roxo por parte de *D. iulia alcionea*, ratificaria a alta plasticidade do hospedeiro registrada previamente para essa espécie em folhas jovens e velhas (Borges 2005). Similarmente ilustra um exemplo de patilha de nicho com uma espécie simpátrica como *H. erato phyllis* que usa também *P. suberosa* como hospedeira, mas não consegue acessar eficientemente o fenótipo roxo devido à alta dependência das larvas a tecidos mais tenros do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badawi A, Awadallah AM, Foda SM (1976) On the biology of olive leaf moth *Palpita unionalis* Hb. (Lep. Pyralidae). Zeitschrift für Angewandte Entomologie 80: 103-110
- Barp EA (2000) Caracterização de duas formas de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae) e seleção por *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae). M.Sc dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 98p
- Barp E A (2006) Ecologia comportamental de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae) frente a variação espaço – temporal dos recursos florais. PhD dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 128p
- Barp EA, Soares GLG, Gosmann G, Machado AM, Vecchi C, Moreira GRP (2006) Phenotypic plasticity in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae): Induction and reversion of two morphs by variation in light intensity. Brazilian Journal of Biology 66 (3): 853-862

- Barp EA, Soares GLG, Giani EJM, Rodrigues D, Moreira GRP (2010) Variation in nectar and pollen availability, sucrose preference, and daily response in the use of flowers by *Heliconius erato phyllis*. *Journal of Insect Behavior* 24(3): 200-219
- Benson WW (1978) Resource partitioning in passion on vine butterflies. *Evolution* 32: 493-518
- Benson WW, Brown KS Jr., Gilbert LE (1976) Coevolution of plants and herbivores: passion flowers butterflies. *Evolution* 29: 659-680
- Bernays EA (1997) Feeding by lepidopteran larvae is dangerous. *Ecological entomology* 22: 121-123
- Bernays EA (1991) Evolution of insect morphology in relation to plants. *Phil Trans. R. Soc. Lond.* 333: 257-264
- Bernays EA, Chapman RF (1994) Host plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, Berlin, 211p
- Borges SS (2005) Padrão natural, preferência alimentar e performance das larvas de *Dryas iulia alcionea* (Lep: Nymphalidae) em relação a idade da folha de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre 33p.
- Bradshaw AD (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* 13: 115-155
- Breedlove DE, Ehrlich PR (1968) Plant-herbivore coevolution: Lupinus an Lycaenids. *Science* 162: 671-672
- Bryant DG, Raske AG (1975) Defoliation of white birch by the birch casebear, *Coleophora fuscadinella* (Lepidoptera: Coleophoridae). *Canadian Entomology* 107: 217-223

- Chew FS (1975) Coevolution of pierid butterflies and their cruciferous foodplants. I. The relative quality of available resources. *Oecologia*, Berlin, 20: 117-127.
- Coley PD (1980) Effects of leaf age and plant life history patterns on herbivory. *Nature* 284: 545-546
- Conover IDJ (1958) *Practical Nonparametric Statistics*. Second edition, John Wiley & Sons Inc, New York, 493p
- Dell'errba R, Kaminski LA, Moreira GRP (2005) O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia* 95: 29-46
- DeWitt TJ, Scheiner SM (2004) *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches*. Oxford University Press, New York. 247p
- Dunlap-Pianka H, Boggs CL, Gilbert LE (1979) Ovarian dynamics in Heliconiine butterflies: programmed senescence versus eternal youth. *Science* 197: 487-490
- Ehleringer JR, Mooney HA (1978) Leaf hairs: effects on physiological activity and adaptive value to a desert shrub. *Oecologia* 37: 183-200
- Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* 18 (4): 586-608
- Elpino-Campos A (2011) Feeding behavior of *Heliconius erato phyllis* (Fabricius)(Lepidoptera: Nymphalidae) larvae on passion vines. *Acta ethologica*: 1-12
- Feeny P (1976) Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology* 51: 565-581
- Ferro VG (1998) Criação de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) em condições semi-naturais. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 49p

- Finkler C, Freitas LB, Bonato SL, Salzano FM (1996) Caracterização molecular de duas formas morfológicas de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). *Brazilian Journal of Genetics* 19: 282
- Gilbert LE (1975) Ecological consequences of a coevolved mutualism between butterflies and plants. In: Gilbert LE, Raven PH (eds) *Coevolution of animals and plants*. University of Texas Press, Austin, pp 210-240
- Gilbert LE, Singer MC (1975) Butterfly ecology. *Annual Review Ecol. Syst.* 6: 365-397
- Gould KS, Kuhn DN, Lee DW, Oberbauer SF (1995) Why leaves are sometimes red. *Nature* 378: 241-242
- Hanson FE (1983) The behavioral and neurophysiological basis of food plant selection by lepidopterous larvae. In: Ahmad S (eds) *Herbivorous insects: host-seeking behavior and mechanisms*. Academic Press, New York, pp 3-23
- Heinrich B (1971) The effects of leaf geometry on the feeding behavior of the caterpillar of *Manduca sexta* (Sphingidae). *Animal Behavior* 19: 119-124
- Jones RE (1991) Host location and oviposition on plants. In: Balley WJ, Ridsdill-Smith J (eds) *Reproductive behavior of insects: individual and populations*. Chapman & Hall, New York, pp 139-171
- Kerpel SM, Moreira GRP (2005) Absence of learning and local specialization on host plant selection by *Heliconius erato*. *Journal of Insect Behavior* 18: 433-452
- Kidd NAC (1976) Factors influencing leaf vein selection in the lime aphid (*Eucallipterus tiliæ* L.). *Oecologia* 23: 247-254
- Lee D, Collins TM (2001) Phylogenetic and ontogenic influences of the distribution of anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants. *International Journal of Plant Sciences* 162: 1141-1153

- Lee D, Gould KS (2002) Why leaves turn red. *American Scientist* 90: 524-531
- Mega NO, Araújo A (2008) Do caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae) show evidence of adaptive behaviour to avoid predation by ants? *Journal of Natural History* 42: 129–137
- Menna-Barreto Y, Araujo AM (1985) Evidence for host plant preferences in *Heliconius erato phyllis* from southern Brazil (Nymphalidae). *Journal of Research on Lepidoptera* 24: 41-46
- Millán;Jiménez C, Chacón P, Corredor G (2010) Development, longevity, and oviposition of *Heliconius charithonia* (Lepidoptera: Nymphalidae) on two species of *Passiflora*. *Revista Colombiana de Entomología* 36 (1): 158-164
- Mugrabi-Oliveira E, Moreira GRP (1996b) Size of and damage on shoots of *Passiflora suberosa* (Passifloraceae) influence oviposition side selection of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 13: 939-953
- Papaj DR, Lewis A (1993) *Insects learning: ecological and evolutionary perspectives*. New York, Chapman & Hall 398p
- Périco E (1995) Interação entre quatro espécies de Heliconiinae (Lepidoptera: Nymphalidae) e suas plantas hospedeiras (Passifloraceae) em uma floresta secundária do Rio Grande de Sul, Brasil. *Biociências* 3: 3-18
- Périco E, Araujo AM (1991) Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolución Biológica* 5: 59-74
- Pigliucci M (2002) *Phenotypic Plasticity: beyond nature and nurture*. Johns Hopkins University Press, Baltimore 328p

Price PW, Bouton CE, Gross p, Mcpheron BA, Thompson JN, Weis AE (1980)

Interactions among three trophic levels: influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Stanford, 11: 41-65

Rathcke BJ (1976) Competition and coexistence within a guild of herbivorous insects.

Ecology 57: 76-87

Rausher M (1978) Search image for leaf shape in a butterfly. *Science* 200: 1071-1073

Rodrigues D, Moreira GRP (1999) Feeding preference of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) in relation to leaf and consequences for larval performance. *Journal of the Lepidopterists Society* 53: 108-113

Rodrigues D, Moreira GRP (2002) Geographical variation in larval host plant used by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Brazilian Journal of Biology* 62: 321-332

Rodrigues D, Moreira GRP (2004) Seasonal variation in larval host-plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) adult body size. *Austral Ecology* 29: 437-445

Roessingh P, Stadler E (1990) Foliar form, colour and surface characteristics influence oviposition behavior in the cabbage root fly *Delia radicum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 57: 93-100

Rosental GA, Berenbaum MR (1991) *Herbivores Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Second edition, vol. 1: The Chemical Participants, Academic Press, San Diego, California

Schlichting CD (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 17: 667-693

- Scriber JM & Slansky F Jr (1981) The nutritional ecology of immature insects. *Annu. Rev. Entomol.* 26: 183-211
- Silva AK (2008) Interação de *Heliconius ethila narcaea* Godart (Lepidoptera: Nymphalidae, Heliconiinae) com passifloráceas ocorrentes no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Dissertação de Mestrado em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul 51p
- Silveira MAPA (2002) Variação da dureza da folha em *Passiflora*, efeito no desgaste das mandíbulas de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae) e conseqüências sobre a herbivoria. Porto Alegre, Dissertação de Mestrado em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul 44p
- Singer MC (1971) Evolution of food plant preference in the butterfly *Euphydryas editha*. *Evolution* 25: 383-389
- Skaltsa H, Verykokidou E, Harvala C, Karabourniotis G, Manetas Y (1994) UV-Protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. *Phytochemistry* 37: 987-990
- Slansky F Jr (1993) Nutritional ecology: the fundamental quest for nutrients, p.29-91. In: Stamp NE & CASEY TM (eds) *Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging*. Chapman & Hall, New York, XIII+587p
- Snedecor GM, Cochran WG (1989) *Statistical methods*. Eight edition, Iowa State University Press. 503p
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155: 349-361
- Sultan E (1995) Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica* 44: 363-383

- Sultan E (2000) Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* 5: 537-542
- Sultan E (2003) Phenotypic plasticity: a case study in ecological development. *Evolution e Development* 5: 25-33
- Swihart CA (1971) Colour discrimination by the butterfly *Heliconius charitonius* Linn. *Animal Behaviour* 19: 156-164
- Swihart CA, Swihart SL (1970) Colour selection and learned feeding preferences in the butterfly, *Heliconius charitonius* Linn. *Animal Behaviour* 18: 60-64
- Swihart SL (1965) Evoked potentials in visual pathway of *Heliconius erato* (Lepidoptera). *Zoologica* 50: 55-61
- Swihart SL (1968) Single unit activity in the visual pathway of the butterfly *Heliconius erato*. *J. Insect Physiol.* 14: 1589-1601.
- Thomas CD (1987) Behavioural determination of diet breadth in insect herbivores: the effect of leaf age on choice of host species by beetles feeding on *Passiflora* vines. *Oikos* 48: 211-216
- Thompson JN, Price P (1977) Plant plasticity, phenology, and herbivore dispersion: wild parsnip webworm. *Ecology* 58: 1112-1119
- Thompson JN, Pellmyr O (1991) Evolution of oviposition behavior and host preference in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 36: 65-89
- Traynier RMM (1986) Visual learning in assays of sinigrin as oviposition releaser for the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 40: 25-33
- Weiss M, Papaj DR (2003) Colour learning in two behavioral contexts: How much can a butterfly keep in mind? *Animal Behavior* 65: 425-434

West-Eberhard MJ (2003) *Development Plasticity and Evolution*. Oxford University press, New York. 816p

Zalucki MP, Clarke AR, and Malcolm BM (2002) Ecology and behavior of first instar larval lepidoptera. *Annual Review Entomology* 47: 361–93

CAPITULO 3

Avaliação preliminar da existência de competição entre *H. erato phyllis* e *D. iulia*

(Lepidoptera: Nymphalidae) *alcionea* no estágio de larva em *P. suberosa*

(Passifloraceae)

Artigo a ser submetido para Oecologia

RESUMO

Passiflora suberosa Linnaeus (Passifloraceae) é principalmente atacada pelas larvas de *H. erato phyllis* (Fabricius, 1775) e *D. iulia alcionea* (Cramer, 1779). Essas duas espécies de heliconíneos apresentam-se em simpatria no RS, apresentando um uso diferencial do hospedeiro onde fêmeas e larvas da primeira espécie parecem mostrar uma restrição de uso pela parte superior do ramo (correspondente às partes jovens da planta) enquanto a segunda espécie exploram indiscriminadamente todo ele (partes jovens e maduras). Avaliamos o padrão de uso de ambas as espécies de heliconíneos quando criadas em conjunto na procura de possíveis interações competitivas que expliquem pelo menos em parte esse comportamento diferencial de uso de hospedeiro, assim como a performance resultante do compartilhamento do mesmo. Demonstramos que larvas de primeiros instares de *H. erato phyllis* estão restritas à parte superior do ramo (folhas jovens) excluindo então mediante condutas agressivas larvas de *D. iulia alcionea* de instares correspondentes à parte posterior do ramo, onde se desenvolveram exitosamente. Esse trabalho demonstra mais uma vez a ampla capacidade que tem *D. iulia alcionea* para explorar as folhas velhas do hospedeiro, já registrada amplamente por outros autores.

Palavras chave: Competição, coexistência, evolução, hospedeiro, herbivoria

INTRODUÇÃO

Passiflora suberosa Linnaeus (Passifloraceae) é principalmente atacada pelas larvas de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* (Lepidoptera: Nymphalidae), duas espécies de heliconíneos comuns na América do Sul que se apresentam em simpatria no Rio Grande do Sul (Perico & Araujo 1991). Porém, embora utilizem praticamente as mesmas plantas

hospedeiras (Dell'Erba *et al.* 2005; Mega & Araújo 2008) o uso do recurso apresenta diferenças. As fêmeas de *D. iulia alcionea* ovipositam preferencialmente nas folhas velhas e as larvas possuem uma alta capacidade para consumir esse tipo de tecido desde o primeiro instar, sem influenciar sua performance (Borges 2005). Por outro lado, as larvas de *H. erato phyllis* preferem utilizar as folhas mais novas, brotos e gavinhas para oviposição (Périco 1995; Mugrabi-Oliveira & Moreira 1996). Conforme demonstrado por Rodrigues & Moreira (1999), a sobrevivência exitosa da prole está condicionada ao acesso das larvas de primeiros instares às partes novas desta espécie de hospedeiro. Levando em conta esse comportamento e a preferência alimentar das larvas de *H. erato phyllis*, que consomem inicialmente as partes novas da planta, usando usualmente a parte apical de um dado ramo durante o primeiro instar (Rodrigues & Moreira 1999), é de se supor que no caso de compartilharem o mesmo ramo, ambas as espécies de heliconíneos em determinado momento do desenvolvimento utilizariam as mesmas folhas. Isto poderia levar a uma competição interespecífica, e possivelmente à posterior exclusão de uma espécie em relação à outra, ou então, à uma coexistência das mesmas (Denno *et al.* 1995). Ainda, segundo Brown (1981), as larvas de *H. erato phyllis* são canibalistas, atacando àquelas existentes em um dado ramo da planta hospedeira.

No entanto, desconhece-se o papel do canibalismo frente ao uso das plantas hospedeiras por parte dos heliconíneos. Em adição, os processos relativos à competição per si não têm sido registrados com frequência em insetos em geral, principalmente porque a teoria correspondente pressupõe a baixa disponibilidade de recursos como a condição necessária para que as interações competitivas aconteçam (Rathcke 1976; Benson 1978) e, no caso dos insetos herbívoros, a oferta de hospedeiros em campo seria geralmente ampla (Denno *et al.* 1995). Por outro lado, Benson (1978) argumenta que os heliconíneos

poderiam se constituir num exemplo importante de competição em Insecta, devido a que a competição por hospedeiros “aptos” entre espécies que requerem hospedeiros bem conservados é severa, devido à existência de uma seleção realizada em relação ao substrato de oviposição e alimentação das larvas. Isto faz com que nem todos os hospedeiros disponíveis numa dada área sejam candidatos a serem por eles utilizados. Não existem, entretanto, evidências experimentais que avaliem os raciocínios propostos por Benson (1978), o que se constitui no objetivo deste estudo, em bases preliminares.

Neste capítulo, avaliamos em condições de laboratório, as conseqüências da criação conjunta de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* em ramos intatos de *P. suberosa* em busca de indícios que surgiram ou não a existência de interações competitivas entre ambas as espécies. Testamos a hipótese que *D. iulia alcionea* será comparativamente plástica quanto ao uso da planta, adaptando seu padrão alimentar ao forrageio de exploração de *H. erato phyllis*, espécie restrita às partes novas do hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos e Plantas

As larvas utilizadas nos experimentos de competição foram obtidas a partir de oviposição de fêmeas mantidas criação em insetario de sombrite, conforme descrito no Capítulo 2.

Delineamento experimental

Foram utilizadas larvas recém-eclodidas de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* (n=1 por espécie), as quais foram dispostas concomitantemente em posição central no botão terminal de ramos intatos padronizados do fenótipo verde de *P. suberosa*. Estes continham

nove folhas apicais (numeradas de L1 a L9, em ordem crescente, conforme à idade), foram dispostos garrafas, e mantidos em condições controladas de câmara climatizada ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 14 horas/luz/dia) ($n=20$). Fizeram-se observações diárias, registrando-se na ocasião a mortalidade das larvas, o instar, o tempo de desenvolvimento, a posição de cada espécie em relação às folhas do ramo, até o empupamento. O alimento foi repostado quando necessário, nesse caso, adicionando ramos contendo folhas das idades subseqüentes, colocando as larvas exatamente onde estavam no momento da troca de alimento de modo a manter a herbivoria o mais parecido possível da original (L6 – L9).

Os dados foram comparados graficamente com aqueles obtidos para o padrão alimentar das larvas de *H. erato phyllis* e de *D. iulia alcionea*, quando criadas isoladamente, em condições similares por Rodrigues e Moreira (1999) e Borges (2005), respectivamente.

Análises estatísticas

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade de variância pelos testes de Shapiro-Wilk W e Bartlett, respectivamente. Devido a não normalidade destes, os resultados da performance de ambas as espécies foram comparados por meio de testes não paramétricos de Mann-Whitney e, a sobrevivência, analisada mediante testes não paramétricos de Log-rank. Os dados relativos ao comprimento das asas anteriores, os quais mostraram uma distribuição normal, foram analisados por meio de testes paramétricos t de Student. Para tal, seguiu-se os procedimentos contidos em Snedecor & Cochran (1989) e Conover (1980) quanto a estatística paramétrica e não paramétrica, respectivamente.

RESULTADOS

Padrões alimentares

O primeiro instar de *H. erato phyllis* localizou-se estritamente no botão terminal e primeira folha. Larvas de primeiro instar de *D. iulia alcionea* usaram principalmente a folha três (Fig. 1). No momento que foram colocadas juntas no meristema apical, larvas de primeiro instar de *H. erato phyllis* deslocaram as larvas de *D. iulia alcionea* para folhas mais velhas. Neste período do desenvolvimento, os confrontos correspondentes resultaram na morte das larvas de *D. iulia alcionea*. Isto não foi constatado nos instares posteriores, onde o uso das folhas foi conjunto.

Sobrevivência

A sobrevivência de *H. erato phyllis* quando criada junto com *D. iulia alcionea* não apresentou diferenças quando comparada com a obtida na sua criação individual, a qual foi feita concomitantemente com a criação conjunta em ramos intatos de *P. suberosa* (teste Log-rank, $P=0.052$, $n=20$). O contrário foi constatado para *D. iulia alcionea*, que apresentou diferenças na sobrevivência quando criada junto com a outra espécie de heliconíneo (teste Log-rank, $P=0.0023$, $n=20$). A sobrevivência de ambas as espécies criadas juntas está registrada na Fig. 2.

Desenvolvimento larval e tamanho dos adultos

Os tempos de desenvolvimento de larvas de *H. erato phyllis* ($U=66.00$, $P= 0.012$, $n=20$) e *D. iulia alcionea* ($U=74.50$, $P= 0.020$, $n=20$) criadas juntas em *P. suberosa* foi significativamente maior quando comparados com as criações de ambas as espécies por separado (Fig.3). O tamanho das asas resultantes da criação conjunta de *H. erato phyllis*

($t=1.28$, $P= 0.21$, $n=16$) e *D. iulia alcionea* ($t=-0.44$, $P= 0.66$, $n=12$) não apresentaram diferenças com as obtidas das criações individuais (Fig. 4).

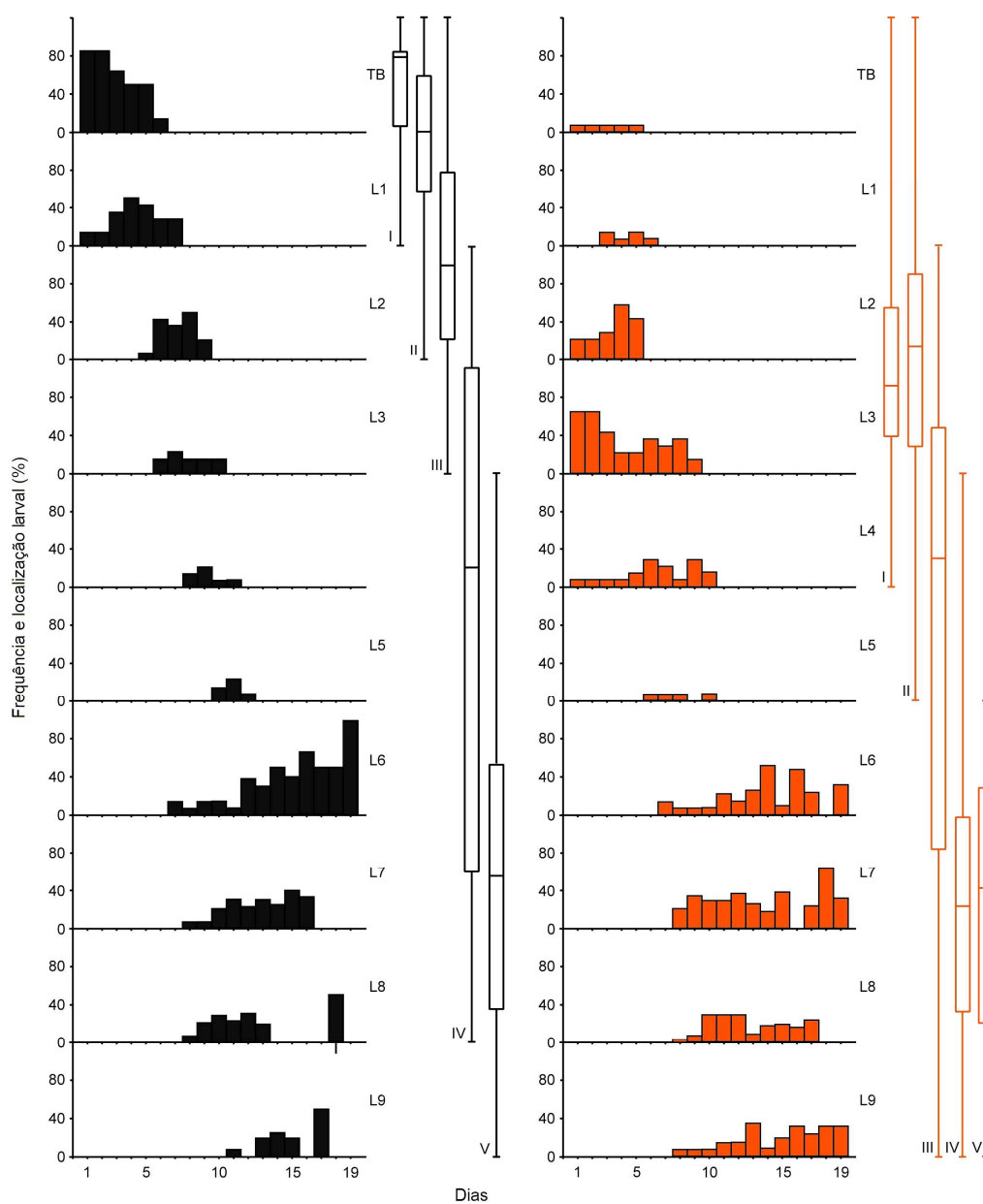


Fig. 1 Padrão alimentar ou idade larval em relação ao instar larval de *H. erato phyllis* (esquerda) e *D. iulia alcionea* (direita) em ramos intactos de *P. suberosa* (n=20). TB: Botão terminal; L, folha aberta. Números arábicos fazem referência à posição na folha em relação ao ápice do ramo. Números romanos representam os instares larvais. Box plots associadas aos números romanos denotam-se a mediana os respectivos quartis, correspondentes à idade da folha utilizada pelo respectivo instar.

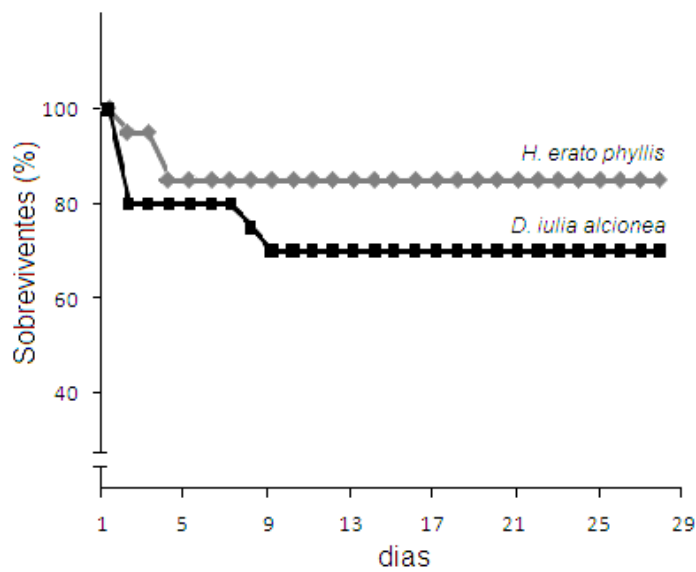


Fig. 2 Curva de sobrevivência larval de duas espécies de heliconíneos sobre ramos de *P. suberosa*. As duas curvas representam comparações individuais da sobrevivência de cada espécie quando criada individualmente vs criada em conjunto. Existem diferenças significativas entre as curvas de sobrevivência de *D. iulia alcionea* enquanto *H. erato phyllis* não apresentou diferenças significativas (teste Log-rank, alfa = 0,05).

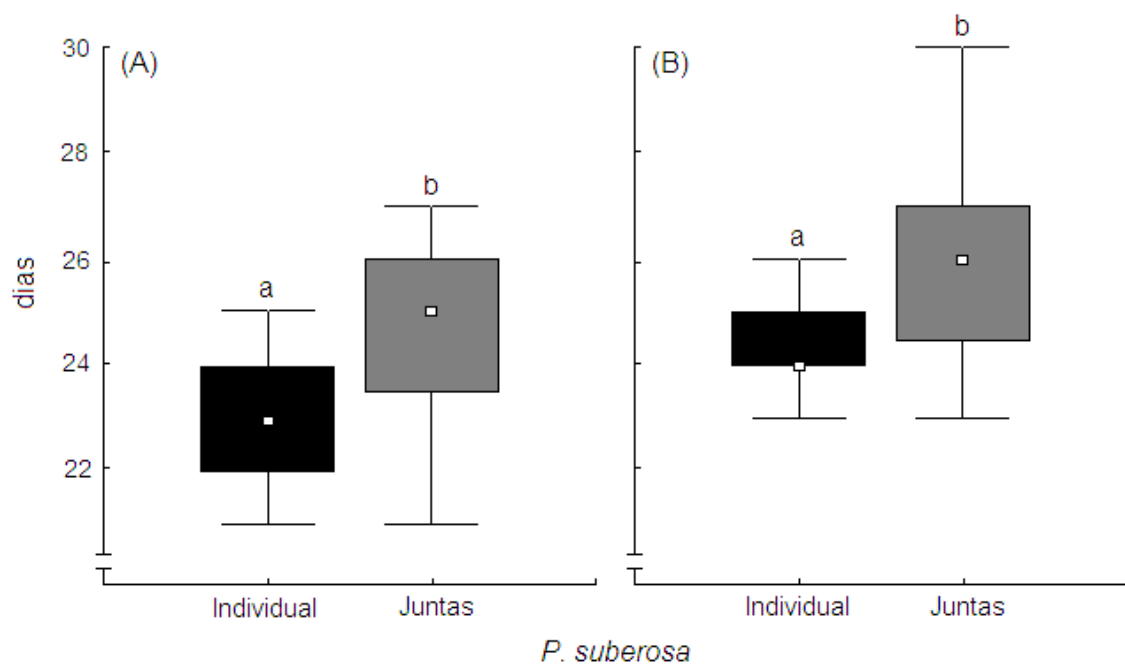


Fig. 3 Tempo de desenvolvimento desde a eclosão das larvas até a emergência dos adultos (A) *H. erato phyllis* e (B) *D. iulia alcionea* quando em partilha sobre ramos intatos de *P. suberosa*. Em cada gráfico boxplots com letras distintas diferem estatisticamente e os quadrados internos representando as medianas e respectivos quartis (teste de Mann-Whitney, alfa= 0,05)

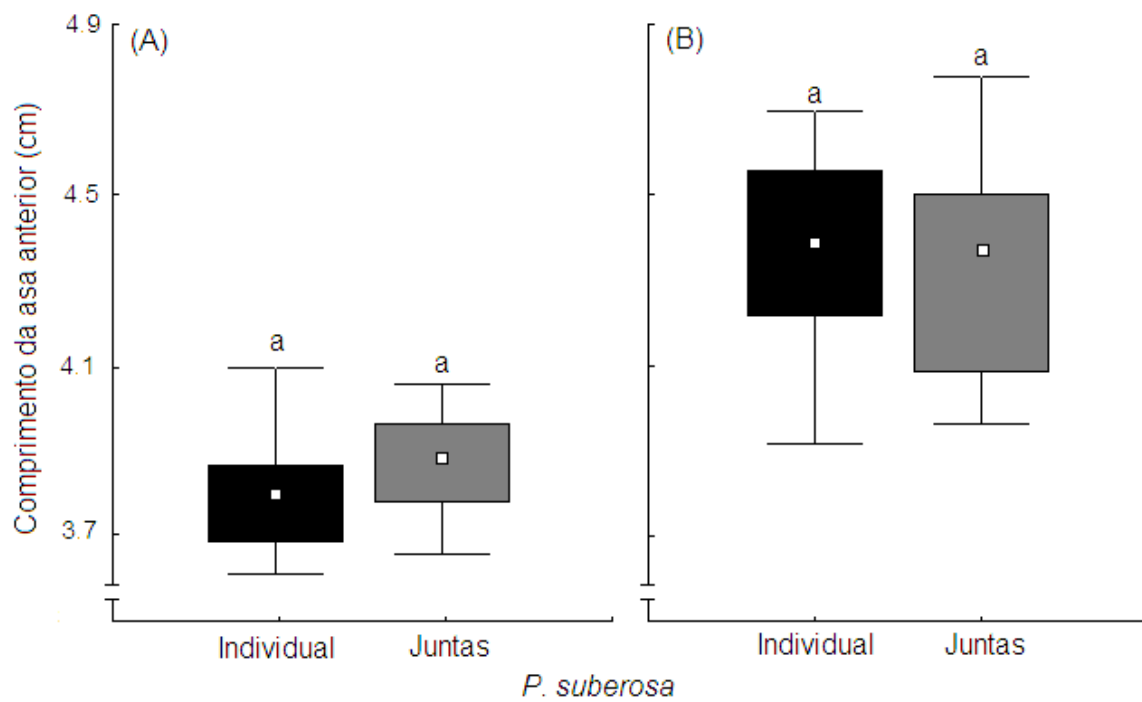


Fig. 4 Tamanho das asas de (A) *H. erato phyllis* e de (B) *D. iulia alcionea* quando criadas juntas vs isoladas sobre ramos de *P. suberosa*. Em cada gráfico boxplots com letras distintas diferem estatisticamente e os quadrados internos representando as medianas e respectivos quartis (teste *t* de Student, alfa = 0,05)

DISCUSSÃO

Os padrões alimentares exibidos pelas duas espécies de heliconíneos criados em conjunto difere dos encontrados por Borges (2005) e Rodrigues & Moreira (1999), onde as criações destas espécies foram feitas isoladas. Encontramos que larvas de *H. erato phyllis* deslocaram às larvas de *D. iulia alcionea* de instares correspondentes (I-III) à parte posterior do ramo, defendendo mediante condutas agressivas sua posição na porção superior (partes jovens) sugerindo então que a dependência de *H. erato phyllis* às folhas jovens esteja associada somente aos três primeiros instares. .

O tempo de desenvolvimento para ambas as espécies foi maior do que o obtido quando criadas sozinhas no mesmo hospedeiro, o que pode representar um custo para ambas as espécies, dependendo da taxa de mortalidade predominante em campo, o que deve ser quantificado. Por outro lado, os tamanhos dos adultos obtidos da criação conjunta foram similares aos obtidos nas criações individuais sugerindo que o compartilhamento do hospedeiro não traz conseqüências reprodutivas para os heliconíneos estudados.

Benson *et al.* (1976) propôs que a oviposição e a alimentação das larvas de *H. erato phyllis* exclusivamente em tecido vegetal jovem poderia estar representando dois mecanismos: Um deles onde essa espécie de heliconíneo evitaria a predação de ovos por parte de formigas, as quais usualmente não forrageiam ativamente nas partes jovens da planta, o um outro mecanismo onde se evitaria a competição interespecífica com outras espécies de heliconíneos especializados em folhas maduras, como *D. iulia alcionea* (Benson 1978). Porém, Borges (2005) sugeriu que a aceitação de folhas novas e velhas por *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* respectivamente obedeceria a um grau diferenciado de plasticidade exibida pelas espécies, que levaria a um papel determinante no estabelecimento de padrões alimentares exibidos pelas mesmas; ou seja, a capacidade de *D. iulia alcionea*

em explorar toda a planta seria mais ampla, em contraste a uma especialização do uso mais restrita (e por tanto defendida) por parte de *H. erato phyllis*.

A diferenciação de nichos entre duas espécies simpátricas que utilizam o mesmo recurso não evidencia competição interespecífica, mas pode ser consequência de coexistência entre elas (Schoener 1974). O uso diferencial de um mesmo hospedeiro por parte de duas espécies poderia ter resultado de vários fenômenos tais como, aqueles que incluem interações competitivas: 1) embora as espécies possam não estar competindo atualmente, seus antecessores poderiam ter competido de tal forma que a marca dessa competição tenha ficado registrada na diferenciação de nichos, comportamento ou morfologia de seus descendentes atuais ou 2) as duas espécies estão competindo atualmente e está acontecendo então uma competição em processo, onde não existiria uma divisão estável do hospedeiro; ou uma causa que não presume interação nenhuma onde 3) as duas espécies evoluíram de forma independente enquanto ao uso do hospedeiro e quando entraram em contato geográfico permaneceram essas diferenças permitindo a coexistência (Schoener 1974; Denno *et al.* 1995).

Por outro lado, competidores coexistentes no tempo presente e espécies em coexistência estável que desenvolveram a capacidade de evitar competição no passado podem parecer as mesmas. Esse trabalho representa o primeiro registro, baseado em dados experimentais, de interações competitivas entre estádios imaturos de heliconíneos. Populações de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea* representam um sistema apropriado para ser estudado na natureza já que se apresentam sempre em simpatria no RS usando *P. suberosa* como hospedeiro; por tanto, são necessários experimentos complementares futuros que avaliem o comportamento de oviposição das fêmeas dessas espécies em *P.*

suberosa e também o uso que as larvas destas fazem em possibilitam em maior grau sua coexistência, seja em *P. suberosa* e/ou hospedeiros alternativos. condições naturais que

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benson WW, Brown KS Jr., Gilbert LE (1976) Coevolution of plants and herbivores: passion flowers butterflies. *Evolution* 29: 659-680
- Benson WW (1978) Resource partitioning in passion on vine butterflies. *Evolution* 32: 493-518
- Borges SS (2005) Padrão natural, preferência alimentar e performance das larvas de *Dryas iulia alcionea* (Lep: Nymphalidae) em relação a idade da folha de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre 33p.
- Brown KS Jr. (1981) The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual Review of Entomology* 26: 427-456
- Conover W (1980) *Practical Nonparametric Statistic*. Second edition, John Wiley & Sons Inc, New York, 493p
- Dell'Erba R, Kaminski LA, Moreira GRP (2005) O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia* 95: 29-46
- Denno RF, McClure MS, Ott JR (1995) Interspecific interactions in phytophagous insects: Competition Reexamined and Resurrected. *Annual Review Entomology* 40: 297-331
- Mega NO, Araújo A (2008) Do caterpillars of *Dryas iulia alcionea* (Lepidoptera, Nymphalidae) show evidence of adaptive behaviour to avoid predation by ants? *Journal of Natural History* 42: 129-137

- Mugrabi-Oliveira E, Moreira GRP (1996) Conspecific mimics and low host plant availability reduce egg laying by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 13: 929-937
- Périco E (1995) Interação entre quatro espécies de Heliconiinae (Lepidoptera: Nymphalidae) e suas plantas hospedeiras (Passifloraceae) em uma floresta secundária do Rio Grande de Sul, Brasil. *Biociências* 3: 3-18
- Rathcke BJ (1976) Competition and coexistence within a guild of herbivorous insects. *Ecology* 57: 76-87
- Rodrigues D, Moreira GRP (1999) Feeding preference of *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera, Nymphalidae) in relation to leaf and consequences for larval performance. *Journal of the Lepidopterists Society* 53: 108-113
- Schoener TW (1974) Resource Partitioning in Ecological Communities. Research on how similar species divide resources helps reveal the natural regulation of species diversity. *Science* 185: 27-39
- Snedecor GM, Cochran WG (1989) *Statistical methods*. Eight edition, Iowa State University Press. 503p

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na avaliação do comportamento de oviposição, escolha e performance larval das fêmeas de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) e *D. iulia alcionea* (Cramer, 1779) nos fenótipos verde e roxo de *Passiflora suberosa* L., constatamos que esse último apresenta características indesejáveis para o desenvolvimento de *H. erato phyllis*, refletindo na preferência de escolha do fenótipo verde por parte das fêmeas, na rejeição das larvas de primeiro instar pelo fenótipo roxo, bem como na alta mortalidade das larvas e na obtenção de adultos significativamente menores nesse. Por outro lado, apesar das fêmeas de *D. iulia alcionea* terem preferido ovipositar no fenótipo verde, as larvas dessa espécie não escolheram nenhum dos fenótipos, consumindo os dois indiscriminadamente. Adicionalmente, o consumo desse fenótipo por parte das larvas de *D. iulia alcionea* não interferiu na sobrevivência nem no tamanho dos adultos, sugerindo então que o fenótipo roxo não apresenta características prejudiciais para essa última espécie de heliconíneo. Sabendo-se da restrição apresentada por *H. erato phyllis* quanto ao consumo de folhas velhas, caracterizadas pela maior dureza, atribuímos as complicações apresentadas pelo fenótipo roxo à dureza das folhas exibido pelo mesmo, assim como o desenvolvimento exitoso de *D. iulia alcionea* a sua alta capacidade para consumir qualquer tipo de tecido, seja este duro ou tenro.

Com relação à partilha de *P. suberosa* exibida pelas larvas de *H. erato phyllis* e *D. iulia alcionea*, na qual a primeira é reconhecida por consumir inicialmente o botão terminal e folhas apicais (jovens) e a segunda por outro lado, por consumir folhas terminais (maduras), demonstramos que *D. iulia alcionea* modifica seu padrão alimentar individual quando é criada em conjunto com *H. erato phyllis*. Ou seja, tal mudança ocorre em consequência do comportamento agressivo das larvas da última espécie, a qual depende das folhas jovens para sua sobrevivência, sobretudo durante os primeiros instares larvais. O compartilhamento da hospedeira pelas duas espécies não implicou em consequências no tamanho dos adultos em relação ao obtido nas criações individuais, entretanto, o tempo de desenvolvimento de ambas foi afetado, sendo significativamente mais longo quando compartilharam o recurso em relação as criações isoladas.

Para que tais aspectos sejam melhor elucidados, sugere-se explorar tal sistema no contexto de exclusão competitiva. Os estudos futuros devem incluir amostragens de campo que permitam esclarecer se as interações antagonistas ocorrem ou não em condições naturais. Sugere-se também explorar sob diferentes enfoques acerca de quais fatores que operam e/ou operaram no passado dessas duas espécies, no estabelecimento da diferenciação de exploração de recursos aqui reconhecida.

ANEXO 1

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA OECOLOGIA

Manuscript submission

Authors must submit their articles to "Oecologia" online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing, review and publication time. After passing a pre-review assessment for journal eligibility by an Editor-in-Chief and a Handling Editor, submitted manuscripts are subject to peer review and copy editing. Please log directly onto the link below and upload your manuscript following the on-screen instructions. For the review process, the manuscript may be submitted as one single file (PDF, Microsoft Word or Rich Text Format with embedded illustrations, tables, etc.). If the manuscript is accepted, original files (not pdf or html) of the final version of the manuscript must be uploaded for production. Online appendices (Electronic Supplementary Material, ESM) must be submitted in a separate file. There is a total file size limit of 60 MB for a manuscript submission, including ESM. If ESM (e.g., video) exceeds this size, please contact the appropriate Editor-in-Chief directly.

Manuscript preparation

- The length of articles should not exceed 10 printed pages (equivalent to approximately 35

submitted pages) including all references, tables, figures, and figure legends. Views and Comments submissions must be limited to 3 to 5 printed pages. One printed page corresponds to approximately 3 submitted pages, 850 words text, or 3 illustrations with their legends, or 55 references. There will be a charge of 100 €, plus 19% VAT, for each page exceeding this limit. Editors typically return manuscripts prior to review that are likely to exceed the page limit.

- Manuscripts must be written in English and double-spaced throughout (including references) with at least 2.5 cm (1 inch) margins. Please write in the active voice using the past tense only for methods and results sections.
- Page numbers are optional but should not be included on tables and figures. Pages in Electronic Supplementary Material (ESM) should be numbered separately.
- Line numbers are required and should run consecutively throughout the text, from the abstract through the figure legends. Do not number lines in tables, figures or ESM.
- Use a normal, plain font (e.g. Times New Roman) for text. Genus and species names should be in italics. The common names of organisms should not be capitalized
- Abbreviations should only be used for terms repeated at least 3 times. Abbreviations should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

- Format dates as day-month-year with months abbreviated: e.g., 01-Jan-2008
- Use the equation editor of a word processing program or MathType for equations. (Note: If you use Word 2007, do not create equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.) Symbols for parameters should be *italicized*.
- Report values in equations, tables, figures and statistics with the number of digits that matches the precision of the data.
- Please always use Unicode (<http://www.unicode.org>) font for non-Roman characters.
Use internationally accepted signs and symbols following the Standard International System of Units (SI, <http://physics.nist.gov/cuu/Units/units.html>) throughout the manuscript (in the text, tables and figures). Avoid complex units wherever possible (e.g use “no. m⁻²” instead of “no. per 16 m²”). Units should use exponent notation and avoid multiplication and division symbols (e.g., “*”, “/”, “x”): i.e., “no. m⁻²” and not “no./m²”).
- Footnotes should not be used, except on the title page or in Tables.
- For indents, use tab stops or other commands, not the space bar.

Manuscript contents (in order)

- **Title page** The title should be concise and informative and less than 200 characters. Short titles (< 15 words) are best and are more often cited. The concept, problem or hypothesis to be tested should be clear from the title. The use of full taxonomic names in the title is discouraged; no taxonomic authorities should appear in titles. On the title page, include name(s) of author(s), the affiliation(s) of the author(s), and the e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author. Include the **declaration of authorship** as a footnote on the title page.

- **Abstract** The abstract should start with theory -based objectives or hypotheses, end with explicit conclusions, and should not exceed 250 words in length. Refrain from giving detailed methods; in most cases the technique becomes obvious by the way results are reported. Avoid writing “is discussed” or “needs further research”, and instead end with a conclusive statement of how the work has furthered our ecological understanding. The abstract should not contain any undefined abbreviations or literature references.

- **Key words** Five key words should be supplied, indicating the scope of the paper and not repeating terms already used in the title. Each keyword should not contain more than two compound words, preferably only one.

- **Introduction**

- **Materials and methods** Some submissions, such as reviews, may depart from the typical format of Methods-Results-Discussion.

- **Results** Avoid “Results are shown in Figure 3”. Instead, say for example, “Biodiversity declined with the addition of nitrogen (Fig. 3).” Be specific: e.g., “positively correlated” instead of “correlated”. Refer to magnitudes of effects (e.g. give effect sizes and confidence intervals) rather than just *P*-values.

- **Discussion**

- **Acknowledgements** Please keep this section as short as possible. Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full. Compliance with ethical standards may be stated in the cover letter rather than the acknowledgements section.

- **References** Literature citations in the text should be ordered chronologically and indicate the author's surname with the year of publication in parentheses, e.g. Carlin (1992); Brooks and Carlin (1992). If there are more than two authors, only the first author should be named, followed by "*et al.*" For example, “Carlin (1992), Brooks and Carlin (2004, 2005), Jones *et al.* (2007) demonstrated...” OR “... well studied (Carlin 1992; Brooks and Carlin 2004, 2005; Jones *et al.* 2007)”. References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, etc. is added to the year both in the text and in the list of references. References should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication.

Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Alphabetize the list of references by the last names of the first author of each work. If

available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of each reference. Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations (www.issn.org/2-22661-LTWAonline.php).

Reference examples:

Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers

Savidge WB, Blair NE (2004) Patterns of intramolecular carbon isotopic heterogeneity within amino acids of autotrophs and heterotrophs. *Oecologia* 139:178-189 doi: 10.1007/s00442-004-1500-z

Chapter in a book: name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers Hobson KA (2003) Making migratory connections with stable isotopes. In: Berthold P, Gwinner E, Sonnenschein E (eds) *Avian migration*. Springer, Berlin, pp 379-391

Book: name and initial(s) of all authors; year; title; edition; publisher; place of publication Körner C (2003) *Alpine plant life*, 2nd edn. Springer, Berlin

Theses: name and initial(s) of author; year; type (e.g., "Master thesis" or "PhD dissertation"); department; institution; place of publication.

Wilson JA (2004) Habitat quality, competition and recruitment processes in two marine gobies. PhD dissertation, Department of Zoology, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

- **Tables** Each table should be submitted on a separate page, with the title (heading) above the table. Tables should be understandable without reference to the manuscript text. Restrict your use of tables to essential material. All tables must be cited in the manuscript text and numbered consecutively with Arabic numerals. Provide dimensions or units for all numbers. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table heading. Tables will be printed with horizontal separation lines only (one below the table's header, one below the column headers, and one at the end of the table); no vertical lines will be printed. Use tab stops to align columns and center numbers around decimals when appropriate. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). The number of decimals presented should be sensible and match the precision of the data. Acceptable file formats for tables include Microsoft Word (.doc), Rich Text Format (.rtf) and Excel (.xls).

- **Figure legends** All figure legends (captions) should be assembled onto a separate page(s) preceding the figures. Each caption should be brief but sufficient to explain the figure without reference to the text. All figures must be cited in the manuscript text and numbered consecutively with Arabic numerals. Please [click here](#) for journal-specific instructions and examples.

- **Figures** Each figure should appear on a separate page, with its figure number but without the figure legend. Figure preparation is critical. Please [click here](#) for journal-specific instructions and examples.

- **Electronic Supplemental Material (ESM)** ESM are on-line appendices and may consist of information that is more convenient in electronic form (e.g. sequences, spectral data); large quantities of original data that relate to the manuscript (e.g. maps, additional tables and illustrations); and any information that cannot be printed (animations, video clips, sound recordings). Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. Figures embedded within the ESM text are fine. If spreadsheets are to be interactive, they should be submitted as .xls files (Microsoft Excel), otherwise submit as PDF. Always use MPEG-1 (.mpg) format for audio, video and animation. It is possible to submit multiple files in a .zip or .gz file. Name the ESM files consecutively, e.g. “ESM3.mpg”. ESM must be numbered and referred to as “Online Resource”. The manuscript text must make specific mention of the ESM material as a citation, similar to that of figures and tables, e.g., “. . . as shown in the animation (Online Resource 3)”. ESM is not subject to copyediting and will be published as received from the author. Authors should format the ESM material exactly as they want it to appear; manuscript title, authors, and contact information for the corresponding authors should be included. Do not include line numbers. ESM will be available in color at no additional charge. Reference to ESM will be included in the printed version.

After acceptance

- **Proofs of accepted manuscripts** The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures.

Authors of manuscripts accepted for publication are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content (e.g. new results, corrected values, title and authorship) are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office that handled the review before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum which will be hyperlinked to the paper. ESM will not be included in proofs (because ESM is not copy edited and will be made available exactly as it was provided by the authors).

- **Copyright Transfer Statement** If a manuscript is accepted after review the "Copyright Transfer Statement" must be signed and returned to the publisher prior to publication. Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. See Springer's "[Instructions for Authors](#)" for more information.

- **Online First** Accepted papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

- **Reprints** Twentyfive reprints (offprints) of each contribution are supplied free of charge.

If you wish to order additional offprints you must return the order form which is provided with the proofs and return it together with the corrected proofs.

• **Springer Open Choice** In addition to our traditional publication process, Springer also provides an alternative open-access publishing option: *Springer Open Choice*. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, and in addition is made freely available through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before free access publication. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author

Springer Open Choice <http://www.springer.com/journal/442>