

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

**Tese de Doutorado**

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA E EVOLUÇÃO DA  
ESTRUTURA MANDIBULAR DE HELICONIINI (LEP: NYMPHALIDAE) EM  
RELAÇÃO AO USO DA PLANTA HOSPEDEIRA  
(*Passiflora* L.)**

**CAROLINA MILLAN JIMENEZ**

**Porto Alegre, Maio de 2016**

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA E EVOLUÇÃO DA  
ESTRUTURA MANDIBULAR DE HELICONIINI (LEP: NYMPHALIDAE) EM  
RELAÇÃO AO USO DA PLANTA HOSPEDEIRA  
(*Passiflora* L.)**

**CAROLINA MILLAN JIMENEZ**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilson RP Moreira

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Sandra Hartz

Prof. Dr. Lucas Kaminski

Prof. Dr. Luiz Ernesto Costa-Schmidt

Porto Alegre, Maio de 2016

Dedico esse manuscrito a todas as pessoas que de uma ou outra forma me acompanharam nesse lindo e árduo caminho que foi meu passo pela UFRGS e a todos aqueles que ainda conseguem se maravilhar com a mágica envolvida na transformação desde uma “simples” lagarta até uma exuberante borboleta.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Gilson RP Moreira pela orientação, pela grande oportunidade que me deu abrindo as portas do seu laboratório e por transmitir seu conhecimento; dele aprendi muito sobre as borboletas Heliconiini e a dedicação que se deve ter ao fazer pesquisa científica.

Aos Doutores Rodrigo Fornel e Gislene Gonçalves pela participação e aporte intelectual aos artigos da minha tese, pois sem a valiosa ajuda deles não teria sido possível concluir meu trabalho.

Aos meus professores do PPG Biologia Animal e PPG Ecologia da UFRGS que me ensinaram muito durante suas palestras e disciplinas.

Agradeço muito especialmente a Silvana Barzotto, secretária do PPG Ecologia da UFRGS, por me ajudar com toda a papelada e as burocracias que implica ser estrangeira e pela disposição para me guiar em tudo que eu precisei durante meu doutorado.

Aos meus colegas, ex-colegas e amigos do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos (LMCI) do PPG- Biologia animal: Denis Santos da Silva, Gabriela Thomaz, Rosângela Brito, Sabrina Campos Thiele, Cristiano Marcondes, Louise Tocchetto, Natielle Pires, Bruna Menezes Ramos, Danessa Boligon, Darli Massardo, Ana Kristina Silva e Kim Barão que me acompanharam durante esses 4 anos de esforço e aprendizado e que sem a ajuda deles não teria conseguido concluir meu trabalho, não só pelas valiosas sugestões que deram para o melhor desenvolvimento do mesmo, como também pela amizade, as tardes de bolo e café no laboratório, os almoços no RU, as fofocas, as risadas, os choros livres e etc.

Aos meus amigos queridos Juliane Bellaver, Sabrina Campos Thiele, Carla Borges, Tamires Defaveri, Kim Barão, Filipe Michels, Fernando Luz, Dirleane Otonelli,

Francine Barenho e Diego Madia pelo apoio emocional, pelas risadas, pelos momentos legais (e os ruins também), os conselhos, o companheirismo constante e por tudo que eles representam na minha vida.

Aos meus pais Alicia e Fernando e minha irmã Paola por apoiar meus sonhos profissionais, mesmo na distância, durante todos esses anos.

Ao meu amor Fabricio pelo carinho e apoio incondicionais nessa etapa da minha vida e por me ajudar a lidar mais pacifica e felizmente com o estresse e a ansiedade da vida acadêmica e o que está por vir.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado concedida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>ARTIGO 1. EVOLUÇÃO DA ESTRUTURA MANDIBULAR DE HELICONIINI (LEP: NYMPHALIDAE) EM RELAÇÃO AO USO DA PLANTA HOSPEDEIRA (<i>PASSIFLORA L.</i>)</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1. Estruturas alimentares e evolução dos insetos herbívoros</b> .....	11
<b>1.2. Interação Heliconiini-Passifloraceae</b> .....	12
<b>1.3. Evolução ontogenética e filogenética da cabeça em Heliconiini</b> ..	14
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
<b>2.1. Criação de larvas</b> .....	16
<b>2.2. Fixação, extração e análises da mandíbula e conteúdo         estomacal</b> .....	17
<b>2.3. Análises alométricas e morfométricas</b> .....	18
<b>2.4. Análises filogenéticas</b> .....	19
<b>3. RESULTADOS</b> .....	20

<b>3.1. Descrição da forma mandibular e conteúdo estomacal de Heliconiini.</b> .....	20
<b>3.2. Mandíbulas na ontogenia de Heliconiini.</b> .....	22
<b>3.3 Mandíbulas na filogenia de Heliconiini.</b> .....	22
<b>4. DISCUSSÃO.</b> .....	24
<b>4.1. Mandíbulas na ontogenia de Heliconiini.</b> .....	24
<b>4.2. Mandíbulas na filogenia de Heliconiini.</b> .....	27
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.</b> .....	33
<b>6. AGRADECIMENTOS.</b> .....	34
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.</b> .....	34
<b>TABELAS E FIGURAS.</b> .....	42
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS.</b> .....	63
<b>ARTIGO 2. PLASTICIDADE FENOTIPICA NA MANDIBULA DE <i>Heliconius erato</i> (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) PELO USO DE DIFERENTES HOSPEDEIROS (PASSIFLORACEAE).</b> .....	65
<b>1. INTRODUÇÃO.</b> .....	67
<b>1.1. Interação inseto-planta, herbivoria e estrutura mandibular em insetos herbívoros.</b> .....	67
<b>1.2. <i>Heliconius erato phyllis</i> e suas hospedeiras pasifloraceas</b> . . . .	71
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.</b> .....	73

2.1. Criação de larvas. ....	73
2.2. Fixação, dissecação e análise da mandíbula. ....	74
2.3. Fixação do músculo adutor mandibular. ....	74
2.4. Análises alométricas e morfométricas. ....	75
3. RESULTADOS. ....	76
4. DISCUSSÃO. ....	77
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS. ....	81
6. AGRADECIMENTOS. ....	81
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. ....	81
TABELAS E FIGURAS. ....	88
LISTA DE TABELAS E FIGURAS. ....	95
<b>ARTIGO 3. INFLUÊNCIA DA IDADE DA FOLHA E GREGARIEDADE NO TAMANHO E FORMA MANDIBULAR EM HELICONIINI (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE). ....</b>	<b>96</b>
1. INTRODUÇÃO. ....	97
1.1. Heliconíneos e Passifloráceas. ....	97
1.2. Interação Heliconiini – Passifloraceae e os padrões alimentares adotados pelas borboletas do maracujá. ....	99

<b>1.3. Idade da folha consumida e o nível de agregação dos heliconíneos e sua influência na evolução das estruturas corpóreas. . . . .</b>	<b>101</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS. . . . .</b>	<b>103</b>
<b>2.1. Criação de larvas. . . . .</b>	<b>103</b>
<b>2.2. Fixação, dissecação e análises da mandíbula. . . . .</b>	<b>104</b>
<b>2.3. Análises morfométricas. . . . .</b>	<b>105</b>
<b>3. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>106</b>
<b>3.1. Hábito alimentar: Gregariedade. . . . .</b>	<b>106</b>
<b>3.2. Hábito alimentar: Idade da folha. . . . .</b>	<b>108</b>
<b>4. DISCUSSÃO. . . . .</b>	<b>108</b>
<b>4.1. Efeitos da gregariedade nas estruturas alimentares dos Heliconiini . . . . .</b>	<b>108</b>
<b>4.2. Efeitos da idade da folha consumida nas estruturas alimentares dos Heliconiini. . . . .</b>	<b>114</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS. . . . .</b>	<b>116</b>
<b>6. AGRADECIMENTOS. . . . .</b>	<b>117</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. . . . .</b>	<b>117</b>
<b>TABELAS E FIGURAS. . . . .</b>	<b>124</b>

<b>LISTA TABELAS E FIGURAS.....</b>	<b>136</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>138</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>140</b>

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO 1 (ARTIGO 1)

**Tabela 1.** Descrição morfológica das mandíbulas de primeiro e quinto instares de onze espécies de heliconíneos. . . . . 42

**Tabela 2.** Inclinações alométricas ( $\beta$ ) correspondentes ao tamanho da cabeça e tamanho da mandíbula de onze espécies de heliconíneos. . . . . 48

**Tabela 3.** Distância genética pareada (Tamura-Nei, 1993) entre 11 espécies de heliconíneos com base em 2836 nucleotídeos, utilizando o método de máxima composição de verossimilhança. Sobrescritos indicam os valores correspondentes às espécies nas colunas. . . . . 49

**Tabela 4.** Distancias fenotípicas de Mahalanobis de primeiro (L1) e quinto instar (L5) entre 11 espécies de heliconíneos. Sobrescritos indicam os valores correspondentes às espécies nas colunas. . . . . 50

**S1.** Descrição das regiões da mandíbula e respectivos pontos anatômicos utilizados nas análises morfométricas . . . . . 51

**S3.** Porcentagens de identificação corretas dos cinco instares larvais de 11 espécies de heliconíneos segundo análise discriminante (LDA) . . . . . 51

### CAPITULO 2 (ARTIGO 2).

**Tabela 1.** Análise de Variação, com valores para os testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, correspondentes às comparações entre o tamanho da cabeça de lagartas de quinto instar *Heliconius erato* criadas com folhas de 4 espécies de *Passiflora*. Asterisco indica diferenças estatísticas significativas. . . . . 88

**Tabela 2.** Comparações alométricas (ANCOVAs) das inclinações ( $\beta$ ) e interceptos ( $\alpha$ ) correspondentes às retas de crescimento do músculo adutor mandibular vs. tamanho mandibular (centroide) de larvas de *Heliconius erato* alimentadas com folhas de 4 espécies de *Passiflora*. Asterisco indica diferenças estatísticas significativas. . . . . 89

### CAPITULO 3 (ARTIGO 3).

**Tabela 1.** Comparações entre o tamanho da cabeça e tamanho da mandíbula de lagartas de quinto instar de *Dione juno* criadas em *Passiflora edulis*. Asterisco indica significância estatística ( $\alpha = 0.05$ ). . . . . 124

**Tabela 2.** Comparações alométricas (ANCOVAs) entre as inclinações e interceptos das retas correspondentes ao crescimento do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular (centroide) de larvas de quinto instar de duas espécies de heliconíneos criados em diferentes densidades. Asterisco indica significância estatística ( $\alpha = 0.05$ ). . . . . 125

**Tabela 3.** Comparações entre o tamanho da cabeça, tamanho da mandíbula e área do músculo adutor mandibular de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas com folhas jovens e maduras de *Passiflora suberosa*. Asterisco indica diferença estatística significativa. . . . . 126

**Tabela 4.** Comparações alométricas (ANCOVAs) das inclinações e interceptos correspondentes às retas de crescimento do músculo adutor mandibular vs. tamanho mandibular (centroide) de larvas de quinto instar de *H. erato* criadas em folhas de duas idades de *P. suberosa*. Asterisco indica significância estatística ( $\alpha = 0.05$ ). . . . . 127

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO 1 (ARTIGO 1).

- Figura 1.** Mandíbula de primeiro instar de *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae), vista mediana. Números se referem aos marcos anatômicos Tipo I usados nas análises morfométricas . . . . . 52
- Figura 2.** A) Localização de pontos anatômicos tipo I em mandíbulas de primeiro e quinto instar de *Heliconius erato*. B – L) Micrografias em microscopia eletrônica de varredura correspondentes a mandíbulas de primeiro (esquerda) e quinto instar (direita) de B) *Heliconius ethila*, C) *Laparus doris*, D) *Heliconius erato*, E) *Heliconius sara*, F) *Heliconius charithonia*, G) *Eueides aliphera*, H) *Dryas iulia*, I) *Dryadula phaetusa*, J) *Philaethria wernickei*, K) *Dione junio* e L) *Agraulis vanillae*. Barra= 50 e 200µm. . . . . 53
- Figura 3.** Micrografias em microscopia eletrônica de varredura correspondentes a partículas contidas no estomago de lagartas de quinto instar de A) *Heliconius ethila*, B) *Laparus doris*, C) *Heliconius erato*, D) *Heliconius sara*, E) *Heliconius charithonia*, F) *Eueides aliphera*, G) *Dryas iulia*, H) *Dryadula phaetusa*, I) *Philaethria wernickei*, J) *Dione junio* e K) *Agraulis vanillae*. Barra= 50 e 200µm. . . . . 54
- Figura 4.** Tamanho das partículas contidas no estomago e o tamanho da mandíbula de lagartas de quinto instar de onze espécies de heliconíneos. Box plots com letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas. . . . . 55
- Figura 5.** Relação entre o tamanho das partículas contidas no estomago e o tamanho das mandíbulas de lagartas de quinto instar de onze espécies de Heliconiini. . . . . 56
- Figura 6.** Tamanho da mandíbula de primeiro (A) e quinto (B) instares, (C) dos adultos e (D) relação entre o tamanho dos adultos e o tamanho do centroide mandibular, de ambos os instares (primeiro em verde e quinto em vermelho), em onze espécies de heliconíneos. Box plots com letras diferentes diferem estatisticamente (ANOVA,  $p < 0,001$ ; testes múltiplos de Tukey,  $p < 0,001$ ) e o asterisco indica existência de diferença estatística entre as inclinações das retas (MANOVA,  $p < 0,001$ ). . . . . 57
- Figura 7.** Variação na altura da capsula cefálica (mm; box plots azuis) e tamanho da mandíbula (centroide; box plots vermelhos) dentre os instares de onze espécies de heliconíneos. Há diferenças estatísticas dentre os instares em todas as espécies (ANOVAs,  $p < 0,001$ ). . . . . 58
- Figura 8.** Variação na altura da cápsula cefálica (mm; quadrados azuis preenchidos) e da mandíbula (centroide; círculos vermelhos) de onze espécies de heliconíneos. As comparações entre as retas correspondentes, usando o total de dados, apresentam diferenças significativas quanto à inclinação em todas as espécies (ANCOVAs,  $p < 0,001$ ). Extremo inferior direito mostra a tendência geral de crescimento das duas estruturas nas onze espécies. . . . . 59
- Figura 9.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares, no primeiro e quinto instar, de onze espécies de heliconíneos. **A)** e **B)** representam as deformações obtidas por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e

componente principal 2 (PC2), respectivamente. Há diferenças dentre os instares das espécies (MANOVAs,  $p < 0,001$ ). . . . .60

**Figura 10.** Árvores Neighbor-Joining (não enraizadas) da A) análise filogenética Bayesiana com base na análise combinada de dados de DNA mitocondrial (COI) e nuclear (EF1 $\alpha$  e *wingless*), totalizando 2836 nucleotídeos e das distâncias fenotípicas de Mahalabonis para forma mandibular de B) primeiro e C) quinto instar de onze espécies de heliconíneos. Entre parêntesis os hábitos alimentares das espécies (RAS: Raspadora; COR: Cortadora; ESC: Escavadora). . . . . 61

**S2.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares dentre os instares de onze espécies heliconíneos. A, B) representam as deformações por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), respectivamente. Linhas contínuas representam deformações na horizontal e linhas tracejadas deformações na vertical, dentro de cada componente. Há diferenças dentre os instares das espécies (MANOVAs,  $p < 0,001$ ). . . . .62

## CAPITULO 2 (ARTIGO 2).

**Figura 1.** Tamanho da A) cápsula cefálica, B) mandíbula e C) área do músculo adutor mandibular de lagartas de quinto instar de *H. erato* alimentadas com folhas de 4 espécies de *Passiflora*. Box plots com letras diferentes diferem estatisticamente (Kruskal-Wallis, seguido de testes de Dunn,  $p < 0,05$ ). . . . . 90

**Figura 2.** A) Retas de crescimento do centróide mandibular (círculos vermelhos preenchidos) e área do músculo adutor da mandíbula (quadrados azuis preenchidos) de lagartas de quinto instar de *H. erato* criadas em 4 espécies de *Passiflora*; B) Variação da área do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular dos indivíduos. Comparações entre as retas correspondentes à área do músculo e a reta do tamanho mandibular em cada hospedeiro, usando o total de dados, apresentam diferenças significativas quanto à inclinação (ANCOVAs,  $p < 0,0001$ ). . . . .91

**Figura 3.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas em quatro espécies de *Passiflora*. **A)** e **B)** representam as deformações obtidas por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), respectivamente. Há diferenças estatísticas dentre as formas mandibulares dos indivíduos criados nas quatro espécies vegetais (MANOVAs,  $p < 0,0001$ ). . . . .92

**Figura 4.** Análise discriminante (LDA) das formas mandibulares de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas em quatro espécies de *Passiflora*. CV1 e CV2 representam as variáveis canônicas 1 e 2, respectivamente. Há diferenças significativas dentre as formas mandibulares dos indivíduos criados nas quatro espécies vegetais (MANOVAs,  $p < 0,0001$ ). . . . .93

**Figura 5.** Árvores Neighbor-Joining (não enraizadas) das distâncias fenotípicas de Mahalabonis para forma mandibular de larvas de quinto instar de *H. erato* alimentadas

com folhas de quatro espécies de *Passiflora*. As ilustrações mandibulares associadas a cada planta hospedeira correspondem à forma média obtida por sobreposição de Procrustes (GPA) dos indivíduos criados em cada hospedeiro. Os ápices observados na parte mais externa da área incisora, ressaltados em vermelho, correspondem às bases dos dentes mandibulares sendo que as pontas destes estão localizadas na parte interna, e se curvam em direção à área molar no quinto instar dos heliconíneos. . . . . 94

### CAPITULO 3 (ARTIGO 3).

**Figura 1.** **A)** Sobrevivência de indivíduos de *Dione juno* (Extraído de Bianchi e Moreira 2005) e *Laparus doris* criadas até a emergência dos adultos em cinco diferentes densidades e **B)** Curvas de sobrevivência de larvas de *L. doris* criadas em cinco diferentes densidades. Box plots com letras diferentes indicam diferença estatística significativa (Testes Qui-quadrado,  $p < 0.0001$ ) e as abreviações D1, D2, D4, D8 e D16 correspondem às criações em densidades de 1, 2, 4, 8 e 16 indivíduos, respectivamente. . . . . 128

**Figura 2.** Tamanho da cápsula cefálica (acima), mandíbula (meio) e área do músculo adutor mandibular (abaixo) de lagartas de quinto instar de *Dione juno* (coluna A) e *Laparus doris* (coluna B) criadas em três diferentes densidades. Box plots com letras diferentes diferem estatisticamente (teste de Kruskal-Wallis, seguido de testes de Dunn,  $p < 0.05$ ). . . . . 129

**Figura 3.** **A)** Retas de crescimento do centroide mandibular (círculos vermelhos preenchidos) e área do músculo adutor da mandíbula (quadrados azuis preenchidos) de lagartas de quinto instar de duas espécies de heliconíneos criadas em *P. edulis* e *P. maliformis* e a **B)** Variação da área do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular dos indivíduos; D4, D8 e D16 indicam a densidades larvais de 4, 8 e 16 indivíduos, respectivamente. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as inclinações e/ou interceptos das retas correspondentes (ANCOVAs,  $p < 0.05$ ). . . . . 130

**Figura 4.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares de lagartas de quinto instar de *Dione juno* (acima) e *Laparus doris* (abaixo) criadas em densidades de 4, 8 e 16 indivíduos. **A)** e **B)** representam as deformações obtidas por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), respectivamente. Para ambas as espécies, há diferenças significativas dentre as formas mandibulares dos indivíduos criados nas diferentes densidades (MANOVAs,  $p < 0.05$ ). . . . . 131

**Figura 5.** Árvores Neighbor-Joining (não enraizadas) das distâncias fenotípicas de Mahalanobis das formas mandibulares de larvas de quinto instar de **A)** *Dione juno* e **B)** *Laparus doris* criadas em três diferentes densidades (4, 8 e 16 indivíduos). As ilustrações mandibulares associadas a cada densidade correspondem à forma média obtida por sobreposição de Procrustes (GPA) dos indivíduos de cada espécie, segundo o nível de agregação larval. Os ápices observados na parte mais externa da área incisora, ressaltados em vermelho, correspondem às bases dos dentes mandibulares sendo que as pontas destes estão localizadas na parte interna, e se curvam em direção à área molar no quinto instar dos heliconíneos. . . . . 132

**Figura 6.** Tamanho da A) cápsula cefálica, B) mandíbula e C) músculo adutor mandibular de lagartas de quinto instar de *H. erato* alimentadas com duas idades de folha de *Passiflora suberosa*. Box plots com letras diferentes diferem estatisticamente (Teste de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). . . . . 133

**Figura 7.** A) Retas de crescimento do centroide mandibular (círculos vermelhos preenchidos) e área do músculo adutor da mandíbula (quadrados azuis preenchidos) de lagartas de quinto instar de *H. erato* criadas duas idades de *Passiflora suberosa* e a B) Variação da área do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular dos indivíduos. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as inclinações das retas correspondentes (ANCOVAs,  $p < 0.05$ ). . . . . 134

**Figura 8.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas em duas idades de folhas de *Passiflora suberosa*. **A)** e **B)** representam as deformações obtidas por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), respectivamente. Não há diferenças dentre as formas mandibulares dos indivíduos criados em folhas jovens e maduras do hospedeiro (MANOVAs,  $p > 0.05$ ). . . . . 135

## RESUMO

Caracteres fenotípicos convergentes em diferentes espécies de insetos herbívoros sugerem uma adaptação funcional a um mesmo hábito alimentar. Nesse sentido, as barreiras apresentadas pelas plantas dificultam o acesso do herbívoro influenciando a evolução de suas estruturas. Espécies de Heliconiini com diferentes padrões alimentares (consumo de tecidos rígidos ou tenros) têm mostrado formas diferenciadas da cápsula cefálica e não existe estudo que explique essas diferenças. Levando em conta que os heliconíneos menos derivados tendem a se alimentar em folhas velhas e os mais derivados em folhas jovens, e que durante o processo de alimentação a mandíbula é a estrutura principalmente associada à mastigação, propomos que dito aumento da cabeça seja devido a modificações sofridas na forma mandibular e ao maior desenvolvimento do músculo adutor da mandíbula, que responde diferencialmente ao tipo de tecido consumido.

Avaliamos as alometrias ontogenética e filogenética das mandíbulas das principais linhagens de Heliconiini criadas nas suas plantas hospedeiras preferidas, e mediante o uso de morfometria geométrica, elaboraremos uma proposta filogenética para ser comparada com as relações filogenéticas reconhecidas para o grupo, que também serão reconstruídas nesse trabalho, com base em marcadores moleculares. Identificamos também mediante a morfologia mandibular se as alterações de forma são causadoras das mudanças cefálicas e se correspondem aos diferentes hábitos alimentares apresentados pelas espécies. Para isso, induzimos alometria mudando quanto o comportamento alimentar de uma espécie restrita a folhas novas (tenras) para folhas velhas (rígidas), na procura de possíveis modificações nas mandíbula e músculo adutor. Adicionalmente, usando análises alométricas da mandíbula e músculo adutor, exploramos um aspecto comportamental importante em Heliconiini: a gregariedade, buscando elucidar se o

incremento na sobrevivência obtida a altas densidades larvais, já reconhecida no grupo, é ocasionada por facilitação alimentar (comportamento) ou por mudanças alométricas nas estruturas alimentares (morfologia).

**Palavras chave:** Forma, hospedeiro, morfometria, alometría, mandíbula, borboletas, hábito alimentar.

## ABSTRACT

Convergent phenotypic traits in different species of herbivorous insects may indicate a functional adaptation to the same feeding habits. The barriers presented by plants hinder the herbivore's access, influencing the evolution of their feeding structures; species of Heliconiini with different feeding patterns (consumption of either tough or soft tissues) have shown different forms of head capsule and there are no studies explaining these differences. Taking into account that the less derived heliconians tend to eat old leaves and the more derived heliconians eat young ones, and that during the feeding process the mandible is main chewing structure, we propose that increase in head size is due to changes in the mandibular form and to greater development of the mandibular adductor muscle that responds differentially to the type of tissue consumed.

We evaluate ontogenetic and phylogenetic allometries of the mandibles from the main lineages of Heliconiini that were reared on their favorite host plants. By using geometric morphometry, we tested a corresponding phylogenetic hypothesis to be compared to the molecular phylogenetic relations recognized to the group, also reconstructed in this work based on molecular markers. We also tested, through mandibular morphology, if the changes in shape are caused by cephalic changes in size and if they correspond to the different feeding habits presented by each species. To do this, we induced allometry by experimentally altering feeding behavior of one species restricted to new leaves (soft) to old leaves (tough), searching for possible changes in the mandible and adductor muscle. In addition, using allometric analysis of the mandible and adductor muscle, we explored an important behavioral aspect in Heliconiini -the gregariousness, trying to elucidate whether increase in the survival rates achieved at high larval densities, already recognized in the group, is caused by food facilitation (behavioral effect) or by allometric changes in the feeding structures (morphological cause).

**Keywords:** Shape, phenotypic plasticity, host, morphometry, allometry, jaw, butterflies, eating habits.

## INTRODUÇÃO GERAL

### **Plasticidade fenotípica. Estruturas alimentares e seu papel na evolução dos insetos herbívoros.**

Plasticidade fenotípica é definida como a capacidade de um organismo em desenvolver distintos fenótipos dependendo do seu ambiente, sendo entendida usualmente como adaptativa (Whitman e Ananthkrishnan 2009). Insetos herbívoros possuem uma alta riqueza de alterações morfológicas em consequência de pressões seletivas, pouco exploradas, que as plantas exercem, sendo possível quantificar essas mudanças em estudos de evolução de caracteres morfológicos. Por exemplo, a convergência de caracteres fenotípicos em diferentes espécies de insetos herbívoros pode indicar uma adaptação funcional a um mesmo hábito alimentar (Bernays et al. 1991).

Plantas apresentam barreiras superficiais, nutricionais e/ou tóxicas dificultando o acesso do herbívoro, influenciando a evolução de suas estruturas. Durante o processo de alimentação, as mandíbulas são encarregadas de cortar o alimento em fragmentos que possam ser ingeridos (Chapman 1998). Em consequência, podem influenciar no tamanho e forma da cabeça de algumas espécies de insetos (Das 1937; Snodgrass 1935; Matsuda 1965; Bernays 1986; Aymoné et al., submetido). A anatomia do músculo adutor (responsável pelo fechamento das mandíbulas) tem sido estudada em ortópteros (Baines et al. 1990), himenópteros (Masuko 1986; Rehder 1989, Paul e Gronenberg 2002) e larvas de Sphingidae (Griss 1990); em geral, é composto por fibras musculares constituídas por sarcômeros curtos associados à rapidez de contração, ou longos que conferem a força e os movimentos lentos às mandíbulas (Muller et al. 1992, Weihmann et al. 2016).

Iseley (1944) e Chapman (1964) elucidaram que pressões ecológicas externas influenciam a evolução da estrutura mandibular de gafanhotos especialistas. Posteriormente, Bernays (1986) demonstrou que o tamanho da cabeça é maior em espécies de gafanhotos e lagartas de *Spodoptera* (Lepidoptera) especializados em gramíneas rígidas, quando comparadas com espécies não especializadas. Ainda, a autora foi capaz de induzir alometria positiva no tamanho da cabeça em relação ao tamanho do corpo de lagartas de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth, 1809) submetidas a diferentes dietas. A alimentação de tecidos rígidos provocou um aumento do músculo adutor mandibular e, portanto, cabeças significativamente maiores do que aqueles indivíduos alimentados com dieta artificial (extremamente macia).

### **Alometria**

Refere-se às diferentes taxas de crescimento entre partes do corpo de um indivíduo (Gould 1966, 1977; Huxley 1950; Gayon 2000). Pode ser classificada em três tipos: 1) ontogenética, mudanças de tamanho e forma das estruturas de um indivíduo durante seu desenvolvimento; 2) estática, relaciona tais parâmetros entre indivíduos coespecíficos, no mesmo estágio de desenvolvimento e, 3) filogenética, que os compara entre espécies, em um mesmo estágio ontogenético, com a finalidade de inferir mudanças filogenéticas (Cheverud 1982; Klingenberg e Zimmermann 1992).

A alometria é útil para a compreensão de padrões ontogenéticos relacionados à adaptação a fatores ecológicos e/ou comportamentais, que levam os organismos a ser tornarem mais capacitados ao uso do ambiente e às restrições que este impõe (Emlen 1996, 1997; Hall et al. 2003; Frankino et al. 2007). Assim, é objeto da seleção natural (Nijhout e Wheeler 1996; Nijhout e Emlen 1998; Stern e Emlen 1999); e, conseqüentemente, passível de avaliação experimental tanto em laboratório quanto em campo.

## **Morfometria geométrica**

Alterações das formas biológicas ao longo da evolução dos grupos envolve fenômenos físicos que podem ser descritos em termos matemáticos na forma de coordenadas cartesianas (D'Arcy Thompson 1917). Dentro desse enfoque, a forma pode ser entendida como uma configuração de pontos que não se alteram por efeitos do tamanho, posição e orientação (Kendall 1977), o qual é a base principal da morfometria geométrica (Bookstein 1991, 1996; Monteiro e Reis 1999; Roth e Mercer 2000; Zelditch et al. 1995; Zelditch et al. 1998; Zelditch et al. 2004).

A morfometria geométrica tem sido amplamente utilizada em análises filogenéticas de espécies aparentadas (Rohlf 1998; Monteiro e Abe 1999), caracterização e diferenciação de genitálias, em estudos de cunho taxonômico (e.g., Prieto et al. 2009), dentre outros. O laboratório onde o presente estudo foi desenvolvido, tem se valido dessa técnica em estudos de cunho ecológico-evolutivo, como por exemplo: 1) para elucidar o caminho ontogenético de estruturas corpóreas de um dado organismo (e.g. Rodrigues et al. 2005); 2) testar o efeito diferencial do uso de plantas hospedeiras na variação intra-específica da forma de insetos herbívoros adultos (e.g. Jorge et al. 2010); 3) avaliar a existência de convergência adaptativa quanto ao hábito alimentar no estágio larval destes, mais precisamente quanto ao tamanho e forma da cápsula cefálica (Aymone 2009).

Assim, sabe-se que as primeiras características alvo de seleção natural são o tamanho e a forma, em diferentes partes corporais dos insetos herbívoros. Porém, são raros os trabalhos abrangentes que tenham se valido da morfologia geométrica para abordar essas relações. Desconhecemos a existência destes quanto à mandíbula em si, uma das principais estruturas envolvidas na ingestão de insetos herbívoros e, assim, passível da influência direta das plantas hospedeiras correspondentes.

### **Interação Heliconiini-Passifloraceae**

As borboletas do maracujá são amplamente estudadas devido à sua participação em anéis miméticos, coloração aposemática, variada distribuição geográfica e pela estreita relação que apresentam com suas hospedeiras (passifloráceas). Neste aspecto, em particular, tem se destacado, por serem reconhecidas como um exemplo de evolução conjunta (Gilbert 1975, 1991; Benson et al. 1976; Futuyma 2000). Ambos se encontram amplamente distribuídas na região Neotropical (Brown e Mielke 1972; Brown 1981).

Atualmente, a tribo Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) possui cerca de 70 espécies distribuídas em 10 gêneros: *Agraulis* Boisduval & Le Conte, *Dione* Hübner, *Dryadula* Michener, *Dryas* Hübner, *Eueides* Hübner, *Heliconius* Kluk, *Laparus* Billberg, *Neruda* Turner, *Philaethria* Billberg e *Podotricha* Michener (Brown 1981).

O gênero *Passiflora* possui atualmente 530 espécies em 23 subgêneros (Ulmer e MacDougal 2004). No Brasil, estima-se que existem aproximadamente 130 espécies, com uma maior representatividade na Amazônia (Killip 1938, Cervi 1997). O gênero é subdividido em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC) Mast, *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC) Rchb e *Passiflora* L (Feuillet e MacDougal 2003). Na região Sul do Brasil ocorrem 23 espécies aproximadamente, onde o subgênero *Decaloba* e *Passiflora* são os mais abundantes.

### **Padrões alimentares em Heliconiini: Idade da folha e gregariedade**

As adaptações morfológicas envolvidas na interação inseto-planta mostram a relação estreita o herbívoro e sua planta hospedeira (Bernays 1991). No caso dos Heliconiini, além da especificidade e preferência de hospedeiros, são reconhecidas altas restrições alimentares que confinam a algumas espécies a condições especiais, enquanto outras são mais plásticas frente ao uso do recurso alimentar. Dentro dos Heliconiini, reconhece-se uma tendência geral na qual as espécies basais alimentam-se de folhas

velhas enquanto as espécies mais derivadas o fazem sobre folhas jovens, exibindo então, padrões alimentares diferenciados (Benson 1976).

Os danos que os tecidos maduros produzem em estruturas bucais dos insetos herbívoros estão associados à maior dureza e alto conteúdo de fibras. Alexander (1961) observou que a mandíbula de lagartas jovens de *Heliconius erato*, que se alimenta de folhas jovens inicialmente, apresenta região incisória com dentes mais amplos e menos definidos do que lagartas da mesma idade de *Dione juno*, que se alimenta só de folhas maduras (mais rígidas), o que supostamente representaria um aparato bucal “menos especializado” em relação ao primeiro, frente ao tipo de folhas utilizado.

Nesse sentido, *H. erato*, que oviposita preferencialmente em folhas jovens (Mugrabi-Oliveira e Moreira 1996), seria um exemplo claro de espécie derivada e restrita quanto ao hábito alimentar. Rodrigues e Moreira (1999) demonstraram que larvas dessa espécie dependem das folhas jovens da planta hospedeira, obtendo uma alta mortalidade quando criadas em folhas velhas. Os autores atribuíram tal fato à incapacidade das larvas para consumir o tecido duro característico de folhas maduras. Adicionalmente, Silveira (2002) e Elpino-Campos (2010) em estudos referentes às consequências do consumo de passifloráceas no desgaste mandibular dessa espécie, evidenciaram que a morfologia mandibular de larvas de primeiros instares é parcialmente adaptada para o consumo de folhas tenras e que o desgaste mandibular destas é maior quando aumentada a rigidez da hospedeira. Por outro lado, Millan et al. (2013) demonstrou que em larvas de *D. iulia*, espécie considerada basal, não houve efeito na sobrevivência nem na performance quando submetidas a alimentação em folhas jovens ou velhas, sendo então considerada uma espécie altamente plástica. Entretanto, o desenvolvimento da estrutura mandibular ao longo da ontogênese da

última espécie ainda não foi medido. Assim, associação desta alta plasticidade a características exibidas pela mandíbula resta a ser testado.

Na tribo Heliconiini, existem também níveis diferentes de sociabilidade, podendo ser classificadas em: solitárias, semi-gregárias ou gregárias (Brown 1981). O hábito gregário acontece em cerca de 50% das espécies dentro dos gêneros *Dione*, *Eueides*, *Heliconius*, *Laparus* e *Neruda* e tem sido considerado um caráter derivado nesse caso, tendo evoluído independentemente pelo menos três vezes dentro do grupo (Beltrán et al. 2007). Afeta fortemente a sobrevivência, principalmente nos instares iniciais, quando a agregação é maior e pode estar associada à facilitação alimentar (efeito comportamental), o que resta a ser explorado (Bianchi e Moreira 2005).

### **Evolução ontogenética e filogenética da cápsula cefálica e músculo adutor das mandíbulas em Heliconiini**

Padrões de desenvolvimento em conjunto com a história de vida e a seleção natural sofrida pelos indivíduos ao longo da ontogênese devem explicar pelo menos em parte a evolução morfológica dos diferentes níveis taxonômicos (Beldade et al. 2002; Smith 2003; Nijhout 2008). A conexão entre ontogenia e evolução tem sido estudada há mais de um século (Haeckel 1866), o que diversos autores têm chamado de “Evo-Devo”; a teoria que une aspectos da biologia evolutiva e do desenvolvimento (Atkison 1992; Hall et al. 2003; Brakefield 2006).

A morfologia e padrões alimentares das espécies de Heliconiini, assim como outras características dos estágios imaturos têm sido utilizados e sinalizados como caracteres importantes para estabelecer as relações dentro da tribo (Alexandre 1961; Dell’Erba et al. 2005; Penz 1999). Alexander (1961) atribuiu uma alta “ineficiência” para consumo de folhas rígidas, por exemplo, às larvas de *E. aliphera* (Godart, 1819),

devido à ausência de cristas e cúspides na borda do maxilar das mandíbulas. Tal aspecto é observado em mandíbulas de espécies que conseguem se alimentar da nervura central, a estrutura mais rígida da folha. No entanto, a autora enfatiza que uma descrição simples da escultura mandibular, como a realizada por ela, para explicar eficiência alimentar ou diferentes padrões alimentares das espécies é arriscado. É importante salientar que na época, a autora não contava com as técnicas adequadas para esse tipo de avaliação, como por exemplo da morfometria geométrica, hoje disponíveis. Ou seja, a escultura da mandíbula em Heliconiini, o uso diferencial por parte das diferentes espécies e a influência do músculo adutor na forma das mesmas devem ser avaliadas nesse contexto, para se chegar a conclusões confiáveis, o que resta a ser feito.

Com respeito da variação da forma frente aos hábitos alimentares dos heliconíneos, Aymone (2006) avaliou a cápsula cefálica de *H. erato*, concluindo que há mudanças alométricas associadas à variação comportamental ao longo da ontogênese e crescimento do músculo adutor das mandíbulas frente ao aumento da rigidez foliar do hospedeiro, refletindo-se nas deformações externas da cápsula cefálica da espécie. Adicionalmente, Aymone (2009), usando sete espécies de heliconíneos do Rio Grande do Sul, além de *H. erato*, evidenciou que tanto a nível ontogenético como filogenético, as espécies avaliadas sofreram variações na forma da cápsula cefálica, porém as árvores fenotípicas baseadas na forma não corroboraram a filogenia molecular reconhecida para o grupo (Beltrán et al. 2007).

Assim, diferenças na forma das cápsulas cefálicas diretamente associadas a hábitos alimentares, indicam a presença de convergências que podem ser guiadas por restrições ontogenéticas (*e.g.* tamanho) e/ou ecológicas (*e.g.* diferentes hospedeiras, comportamento). Neste sentido, são escassos estudos que levem em conta tais restrições e que avaliem as mudanças na forma, tamanho e taxas de crescimento das estruturas

diretamente relacionadas com processos de alimentação, mandíbulas e músculo adutor, o que constitui a principal prioridade do presente trabalho.

O objetivo desse trabalho é determinar possíveis variações no tamanho e na forma das mandíbulas entre linhagens de *Heliconiini* e identificar possíveis alterações alométricas ao longo da ontogênese e entre as espécies, quanto às mandíbulas e músculo adutor mandibular. Posteriormente, buscamos determinar se os distintos hábitos alimentares adotados pelas linhagens de *Heliconiini* afetam (ou não) a evolução das estruturas alimentares.

## **CAPITULO 1.**

**EVOLUÇÃO DA ESTRUTURA MANDIBULAR DE HELICONIINI (LEP:  
NYMPHALIDAE) EM RELAÇÃO AO USO DA PLANTA HOSPEDEIRA  
(PASSIFLORA L.).**

Carolina Millan<sup>1</sup>, Gislene L. Gonçalves<sup>2</sup>, Rodrigo Fornel<sup>3</sup>, Gilson R.P. Moreira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500,91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, lepidoptera.azul@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500,91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, gislene.ufrgs@gmail.com

<sup>3</sup>Departamento de Ciências, Laboratório de Ecomorfologia, Animal, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Rua Sete de Setembro, 1621, 99700-000, Erechim, Brasil, rodrigofornel@hotmail.com

<sup>4</sup>Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500,91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, gilson.moreira@ufrgs.br

Título corrente: Evolução mandibular em Heliconiini

## **RESUMO**

Em insetos, o tamanho e forma da mandíbula estão associados às características do alimento. Em heliconíneos, folívoros no estágio larval, podem ser influenciadas por variações no comportamento, como a variação na idade da folha consumida e grau de agregação. Mudanças na mandíbula durante a ontogênese larval de onze espécies de

Heliconiini foram analisadas e comparadas quanto à alometria e variação na forma, usando morfometria geométrica. As divergências foram comparadas com a filogenia, reconstruída com base em sequências de DNA. Trabalhamos sob a hipótese que a forma e tamanho mandibulares variam devido à idade da folha consumida e/ou grau de gregariedade apresentado pelas espécies de heliconíneos, dissociada da filogenia mas diretamente relacionada com a ontogenia das mesmas. Constatou-se mudanças ontogenéticas e filogenéticas do tamanho e da forma mandibular para todas as espécies. O tamanho da mandíbula apresentou alometria positiva com relação ao tamanho da cabeça. Diferenças de forma foram expressivas ao final da ontogênese. *Dione juno* e *Laparus doris*, espécies afastadas filogeneticamente, convergiram a uma mandíbula raspadora relativa ao hábito gregário destas. Espécies de *Heliconius* apresentaram mandíbulas “cortadoras” associadas ao consumo de folhas jovens desde o início da ontogênese. *Dryadula phaetusa* e *Philaethria wernickei* apresentaram mandíbulas “raspadoras”, com alta convergência no quinto instar, de acordo com seu hábito de consumir folhas maduras desde início da ontogênese. *Eueides aliphera*, que se alimenta de folhas velhas, foi a única espécie que apresentou mandíbula “escavadora”, considerada um tipo de mandíbula intermediária entre as formas raspadora e cortadora. Assim, a existência de convergências quanto a forma da mandíbula, dissociadas da filogenia e associadas ao hábito alimentar, é demonstrada para esses heliconíneos.

**Palavras-chave.** Alometria, apêndices bucais, convergência adaptativa, gregariedade, dureza foliar, heliconíneos.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Estruturas alimentares e evolução dos insetos herbívoros

As plantas, consideradas o entorno mais influente durante a vida dos insetos herbívoros, usualmente desenvolvem barreiras que dificultam o acesso dos mesmos, influenciando a evolução de estruturas alimentares (Chapman 1964); a morfologia mandibular em insetos mastigadores depende das características do alimento consumido. Durante o processo de alimentação, as mandíbulas entram em contato com um potencial recurso alimentar, determinando se este pode ou não ser ingerido (Chapman 1998); em alguns casos, dependendo da plasticidade no consumo, esta decisão influencia o tamanho e forma da cabeça dos insetos (Bernays 1986) trazendo consequências importantes para o desenvolvimento.

De forma geral, apresenta dois côndilos de inserção à região cefálica, uma região distal que compõe a região incisora, onde se situam os dentes responsáveis por cortar o alimento e uma região proximal denominada “molar” que tem a função de moer, triturar e macerar. Cada dente da região incisora é inervado por receptores sensoriais que detectam a dureza do alimento e modulam a força necessária para o mesmo ser mastigado (Scoble 1992, Weihmann et al. 2015). Por ser uma estrutura altamente seletiva e devido à sua importância na seleção do alimento, as mandíbulas podem apresentar divergências interespecíficas quanto à forma naqueles gêneros cujas espécies usam uma ampla gama de hospedeiros, e também adaptações especializadas nos casos onde os organismos desenvolvem uma relação estreita (oligofagia/monofagia) com suas plantas hospedeiras (Iseley 1944, Chapman 1964).

No que se refere a mudanças de tamanho de estruturas corpóreas, Bernays (1986) constatou aumento proporcional da cabeça de gafanhotos e lagartas especializadas em gramíneas rígidas, quando comparadas com espécies não especializadas. Adicionalmente, obteve sucesso ao induzir alometria positiva entre o tamanho da cabeça e tamanho do corpo de lagartas de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth,

1809) submetidas a diferentes dietas; nesse caso, tecidos rígidos provocaram aumento do músculo adutor mandibular e portanto, cabeças maiores do que cabeças submetidas a dietas macias.

Por outro lado, características do hospedeiro associadas principalmente a maior dureza e alto conteúdo de fibras nas folhas podem produzir também alto desgaste (Djain e Pathak 1967; Raupp 1985; Wallin 1988) e danos no aparelho bucal do herbívoro (Rauscher 1981, Silveira 2002). A exploração de um recurso alimentar para o qual uma estrutura mandibular não está adaptada, pode levar a altas taxas de mortalidade. Walker (1985) demonstrou que ninfas de primeiros instares do hemíptero *Parabemisia myricae* (Kuwana, 1927) não conseguem perfurar cutículas grossas de folhas maduras de *Citrus* tão eficientemente como os adultos, já que o tamanho do estilete desses indivíduos não possui o tamanho suficiente para atingir o floema (seiva) do qual essa espécie se alimenta.

## **1.2. Interação Heliconiini-Passifloraceae**

Os heliconíneos são estudados pela estreita relação de especificidade que apresentam com suas plantas hospedeiras (passifloráceas) e se destacam como exemplo de evolução conjunta (Benson et al. 1975; Futuyma 2000). Atualmente, a tribo Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) possui cerca de 10 gêneros e 70 espécies: *Agraulis* Boisduval e Le Conte, *Dione* Hübner, *Dryadula* Michener, *Dryas* Hübner, *Eueides* Hübner, *Heliconius* Kluk, *Laparus* Billberg, *Neruda* Turner, *Philaethria* Billberg e *Podotricha* Michener (Brown 1981).

As radiações dos heliconíneos enquanto ao uso das Passifloraceae têm sido diversas, sendo que cada centro de radiação possui tipos morfológicos similares que apresentam convergências comportamentais no que se refere a utilização do recurso (Benson et al. 1975). O hábito alimentar das larvas dos heliconíneos pode ser

influenciado por pelos menos dois fatores comportamentais: o consumo de folhas de diferentes idades e o grau de gregariedade correspondentes (Benson et al. 1975). O primeiro refere-se a espécies menos derivadas, que se alimentariam de folhas velhas desde o início do seu desenvolvimento; espécies mais derivadas, por sua vez, investem no consumo de folhas jovens. A gregariedade favoreceria o desenvolvimento, proporcionando uma diminuição da competição, facilitação alimentar (Bianchi e Moreira 2005) e aumento da proteção contra parasitas e predadores. Os dois comportamentos, consumir folhas de diferentes idades e grau de gregariedade, teria surgido como consequência da saturação do recurso disponível no ambiente, pelo que a adição de novas espécies requereu a aquisição de novas adaptações alimentares para coexistir com as antigas (Benson et al. 1975).

Os danos que os tecidos maduros produzem em estruturas bucais dos insetos herbívoros estão associados à dureza do alimento (Bernays et al. 1991). Alexander (1961), em um estudo morfológico preliminar, analisou as mandíbulas de seis espécies de heliconíneos. Suas observações mostraram que *Heliconius erato*, espécie que utiliza folhas jovens, apresenta dentes conspícuos com crestas e cúspides bem definidas. Por outro lado, *Dione juno* e *Dryadula phaetusa*, que se alimentam de folhas mais rígidas, possuem mandíbulas com crestas menos pronunciadas, cúspides mais amplas e processo molar separado da borda maxilar. Adicionalmente, a autora descreve as mandíbulas de duas espécies de *Eueides* (*E. aliphera* e *E. isabella*) como “raspadoras” durante os dois primeiros instares, sendo inadequadas para mastigação, por não possuírem crestas nem cúspides pronunciadas na borda maxilar e por ter um processo molar separado, aplanado e liso; sem especificar características objetivas para os instares subsequentes.

Rodrigues e Moreira (1999) atribuíram a dependência de larvas de *H. erato* às folhas novas do hospedeiro à incapacidade dos indivíduos jovens para consumir o tecido rígido característico de folhas maduras de *Passiflora suberosa*. Adicionalmente, Silveira (2002) e Elpino-Campos (2010) evidenciaram que mandíbulas de larvas de primeiros instares possuem dentes mais pontiagudos na área incisora e com a região posterior conspícua, adaptados para rasgar e consumir folhas tenras, e que o desgaste mandibular é maior quando aumentada a rigidez da hospedeira. Por outro lado, Millan et al. (2013) demonstraram que *D. iulia*, espécie menos derivada e associada ao consumo de folhas velhas, não teve repercussões, quanto a sobrevivência, quando submetida à alimentação em folhas jovens ou velhas, sendo então considerada uma espécie altamente plástica no seu hábito alimentar. Estudos sobre a relação entre morfologia mandibular e hábito alimentar desta espécie e outras da linhagem dos heliconíneos além das mencionadas por Alexander (1961), são inexistentes.

Na tribo Heliconiini, a gregariedade acontece em cerca de 50% das espécies dentro dos gêneros *Dione*, *Eueides*, *Heliconius*, *Laparus* e *Neruda* tendo sido considerada uma característica derivada que evoluiu independentemente pelo menos três vezes dentro do grupo (Beltrán et al. 2007). O hábito gregário afeta fortemente a sobrevivência, principalmente nos 14epidopt iniciais; e quando a agregação é maior pode estar associada à facilitação alimentar (Bianchi e Moreira 2005).

### **1.3. Evolução ontogenética e filogenética da cabeça em Heliconiini.**

Padrões de desenvolvimento e a seleção natural dos indivíduos ao longo da ontogênese explicam em parte a evolução morfológica dos grupos animais (Nijhout 2008). A morfologia e padrões alimentares das espécies de Heliconiini têm sido utilizados como caracteres diagnóstico para estabelecer as relações dentro da tribo (Alexandre 1961; Penz 1999). Alexander (1961) atribuiu uma alta “ineficiência

alimentar” das larvas de quinto instar de *E. aliphera* para se alimentar de tecidos rígidos devido à ausência de cristas na maxila, característica comumente observada em espécies que se alimentam da nervura central, sempre rígida. No entanto, a autora enfatizou que usar descrições simples para explicar eficiência mandibular de todas as espécies de modo geral era arriscado, mas que até então, a mera descrição era a única ferramenta disponível. Na época, não existiam recursos analíticos precisos para esse tipo de avaliação, como a morfometria geométrica e pacotes estatísticos para computadores pessoais, hoje disponíveis para auxiliar descrições e comparações estruturais mais objetivas.

No que se refere à forma da cabeça frente aos hábitos alimentares dos heliconíneos, Aymone (2006) avaliou a evolução da cápsula cefálica de *H. erato*, concluindo que há variações alométricas ao longo da trajetória ontogenética e crescimento do músculo adutor das mandíbulas em relação ao aumento da rigidez foliar do hospedeiro. Adicionalmente, Aymone (2009) evidenciou que as espécies de heliconíneos do Rio Grande do Sul sofreram variações na forma da cápsula cefálica, mas suas análises filogenéticas não concordaram com a filogenia molecular reconhecida para o grupo (Beltrán et al. 2007). Assim, diferenças na forma da cabeça diretamente associadas a hábitos alimentares poderiam indicar a presença de convergências adaptativas guiadas por restrições ontogenéticas (tamanho) ou ecológicas (hospedeiras, comportamento), divergindo das relações filogenéticas.

Silveira (2002), em estudo com *H. erato*, demonstrou que, diferente ao observado em relação à cápsula cefálica, não existe diferença quanto ao tamanho da mandíbula nos indivíduos, sugerindo que o investimento nessa estrutura independe da planta hospedeira utilizada. Neste sentido, são necessários estudos mais completos e rigorosos que avaliem mudanças das estruturas diretamente relacionadas com

mandíbula e processos alimentares das espécies de heliconíneos e levem em conta essas restrições ontogenéticas.

Estudos prévios utilizando morfometria geométrica de algumas espécies de Heliconiini evidenciaram alterações alométricas e de forma da cápsula cefálica ao longo da ontogênese associadas aos padrões alimentares. Portanto, são indispensáveis estudos mais rigorosos que permitam esclarecer as relações de aumento de tamanho cefálico com a estrutura mandibular e os padrões alimentares das espécies do grupo. Assim, testamos a hipótese que o tamanho e a forma da mandíbula dos heliconíneos, correlacionado com o tamanho e forma da cápsula cefálica, variam entre as espécies, estando relacionados ao consumo de diferentes idades de folha e/ou grau de gregariedade, de forma dissociada da filogenia destes, mas diretamente associada à ontogenia.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Criação de larvas**

As larvas foram obtidas de ovos de fêmeas mantidas em 16epidopte, previamente coletadas em diferentes locais de Porto Alegre RS, e criadas em condições ambientais controladas de laboratório, no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, sobre ramos da hospedeira, conforme descrito em Ferro (1998). As plantas foram provenientes de uma criação de passifloras existente no local. Para espécies oligófagas, a criação foi feita na hospedeira que confere melhor aptidão para a espécie (Brown 1981, Périco e Araújo 1995, Silva et al. 2014). As espécies utilizadas, em ordem filogenética, foram: *Heliconius ethila* (criada em *P. alata*, n=47), *Laparus doris* (*P. malliformis*, n=40), *Heliconius erato* (*P. suberosa*, n=47), *Heliconius sara* (*P. haematostigma*, n=39), *Heliconius charithonia* (*P.*

*rubra*, n=23), *Eueides aliphera* (*P. ametistina*, n=43), *Dryas iulia* (*P. suberosa*, n=46), *Dryadula phaetusa* (*P. rubra*, n=45), *Philaethria wernickei* (*P. actinia*, n=39), *Dione juno* (*P. edulis*, n=52) e *Agraulis vanillae* (*P. caerulea*, n=47). Vouchers

correspondentes encontram-se depositados na coleção do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos (LMCI) da UFRGS, sob o código de acesso LMCI 250-X.

## **2.2 Fixação, extração e análises da mandíbula e conteúdo estomacal**

Para cada instar larval, um dia após ter efetuado a muda, em torno de 10 indivíduos por espécie foram fixados em Dietrich e preservados em álcool 70%. As cápsulas cefálicas foram dissecadas e subdivididas por corte sagital e central. Usando a metade esquerda, foi medida a distância da inserção do côndilo anterior à base do esôlo dorsal, dita medida foi utilizada como referência ao tamanho da cabeça. As mandíbulas foram dispostas em posição horizontal sobre lâmina de microscopia coberta com fita branca de dupla face para garantir fixação, utilizando-se os côndilos como referência. Posterior à montagem, as mandíbulas foram fotografadas em vista frontal com câmera digital Nikon® DS-U3 montada em um microscópio Nikon® AZ100M, usando o software de imagem NIS-Elements para posteriores análises alométricas e morfométricas. Para observações mais detalhadas, mandíbulas adicionais (n=66, 3 por instar/espécie) foram examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM5800 no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Para tanto, as mandíbulas foram desidratadas ao ar livre, montadas com fita dupla face em bases metálicas, e revestidos com ouro em um Bal-Tec SCD 050.

Para realizar observações detalhadas do tamanho e forma das partículas contidas no estômago das larvas, indivíduos das onze espécies de heliconíneos estudados (n= 2 indivíduos/espécie) foram dissecados em laboratório e extraído o conteúdo estomacal; o

material extraído foi posteriormente depositado em cápsulas porosas individuais, desidratado em sequência alcoólica (70%, 90%, 90% e 100%) e levado a ponto crítico com a finalidade de obter fotografias em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM5800 no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Para determinar possíveis diferenças de tamanho entre as partículas no estômago das espécies, as fotos obtidas na microscopia eletrônica foram analisadas e medidas no programa Axio Vision Rel. 4.8. por meio de estatística não paramétrica.

### **2.3 Análises alométricas e morfométricas**

Para fins comparativos referentes ao tamanho das mandíbulas das larvas em relação ao tamanho dos indivíduos e, devido à evidente subjetividade dos dados provenientes de medições corporais em larvas (corpos moles e flexíveis) para serem correlacionados com a mandíbula, foi medido o comprimento da asa de borboletas adultas das 11 espécies estudadas ( $n=15/\text{espécie}$ ), as quais foram usadas como referência de tamanho de cada espécie. Os indivíduos utilizados foram obtidos da coleção do Laboratório de Morfologia e comportamento de insetos da Universidade (UFRGS).

A presença de alometrias ontogenética e filogenética nas mandíbulas de larvas foi testada por meio da correlação de Pearson e ANCOVA (GraphPad Prism 5.00) entre as retas correspondentes ao tamanho da cápsula cefálica (mm) e tamanho do centroide mandibular.

A digitação de marcos anatômicos mandibulares e sua localização em coordenadas cartesianas foi feita sobre fotos utilizando o programa TPSdig 2.16 (Rohlf 2010), sendo considerados 17 marcos anatômicos Tipo I (denominados com números) e

consideradas regiões anatômicas de interesse por Moreira et al. (dados não publicados) (Fig. 1) (para descrição detalhada ver S1 Material suplementar).

As análises das deformações foram feitas utilizando PCA e MANOVA obtidas no ambiente de análises estatísticas “R”, mediante os pacotes MASS, Ape, ade4, stats (Development Core Team 2008) e a forma mandibular analisada com o método de sobreposição de Procrustes (Rohlf e Slice 1990). Para resumir as variáveis, foram utilizadas análises de componentes principais (PCA) com os resíduos de Procrustes. Com esses resíduos testamos a significância da variação ontogenética e filogenética da forma, usando análises multivariadas de variância (MANOVA).

Foram feitas análises de deformações relativas (Rohlf 2006) graficamente através da função “Thin Plate Splines” (Adams e Rosenberg 1998). As relações de proximidade filogenética fenotípica foram estabelecidas através de distâncias de Mahalanobis (1936) e árvores Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987) não enraizadas.

#### **2.4 Análises filogenéticas**

Para fins de comparações estatísticas de matrizes, relações filogenéticas entre as 11 espécies de heliconíneos foram reconstruídas a partir de 2836 nucleotídeos sequenciados de regiões mitocondriais (citocromo oxidase [COI]) e nucleares (*Elongation 19epid-1 $\alpha$*  [EF1- $\alpha$ ] e *wingless* [WG]) e disponibilizados por Beltrán et al (2007) e Massardo et al. (2015). Utilizou-se o método de análise bayesiana no software BEAST 2 (Bouckaert et al. 2014). O modelo de evolução das sequências para o conjunto de genes particionado (mitocondriais + nucleares concatenados) foi estimado de acordo com o critério de informação de Akaike (GTR+I+G, para ambos) utilizando o programa Jmodeltest (Posada 2008). Quatro cadeias de Markov e Monte Carlo foram rodadas simultaneamente; cada cadeia foi iniciada a partir de uma árvore aleatória e

replicada para um milhão de gerações amostrando uma árvore a cada centésima geração. Os escores dos valores de verossimilhança das amostras foi plotado contra o tempo de geração para determinar quando a cadeia se tornou estacionária. Todos os pontos amostrais anteriores a estabilidade (2.000 árvores) foram descartados como amostras *burn in*. Os dados remanescentes após o descarte de amostras *burn in* foram utilizados para gerar uma árvore consenso de regra majoritária onde a porcentagem de amostras recobrindo qualquer clado em particular representaram a probabilidade posterior do clado. As probabilidades posteriores acima de 90% foram consideradas indicativas de significância de suporte.

Também foi gerada uma matriz de distância entre as sequências dos 11 táxons através do método de máxima composição de verossimilhança, assumindo a distância de Tamura–Nei (1993) no software Mega 6 (Tamura et al. 2011). A verossimilhança composta foi definida como a soma de valores de verossimilhança relacionados. A distância pareada e os parâmetros de substituição relacionados foram estimados com precisão através da maximização da verossimilhança composta (Tamura et al. 2011).

A matriz de distância filogenética foi correlacionada (Correlação de Pearson, teste bilateral) com a matriz de dados morfológicos utilizando o teste de Mantel (Mantel 1967) com 10000 permutações ( $\alpha = 0.05$ ) no programa Xlstat<sup>®</sup>.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Descrição da forma mandibular e conteúdo estomacal de *Heliconiini***

O primeiro instar das espécies estudadas apresentou seis dentes conspícuos na região incisora, os quais sofreram modificações diversas no quinto instar (deslocamento, achatamento ou redução) dependendo da espécie (Tabela 1), as quais,

analisando o transcurso ontogenético das espécies (S2 Material suplementar) e porcentagens de classificação corretas para todos os instares (S3 Material suplementar), não foram ocasionadas por processos de desgaste.

De forma geral, o padrão de forma para a região molar do primeiro instar apresentou-se pouco desenvolvida (praticamente lisa). Já no quinto instar, dependendo da espécie, apresentou-se pouco desenvolvida favorecendo mandíbulas côncavas ou pelo contrário, muito bem desenvolvidas, exibindo crestas e tubérculos fortemente erguidos na sua superfície. Nessa mesma região foi possível também constatar algumas ornamentações assemelhando-se a “escamas” (Fig. 2). Outro padrão foi o deslocamento dos dentes da região incisora (pontos anatômicos 7 a 17) em direção ao côndilo anterior da mandíbula (ponto anatômico 3). Na região incisora, a fusão da cúspide 7 com sua incisão 8 também aconteceu em todas as espécies. Houve registro de dois casos especiais: *Dryadula phaetusa*, onde os dentes correspondentes aos landmarks 9, 11 e 13 apresentaram um forte achatamento, e *Philaethria wernickei*, onde o dente 9 esteve ausente (devido a fusão com sua respectiva incisão ponto anatômico 10) e o dente 11 apresentou-se fortemente achatado. Adicionalmente, o ponto anatômico 2 (localizado entre os côndilos) do quinto instar apresentou afastamento em direção oposta à região incisora e a aproximação da região molar (pontos anatômicos 4 e 5) à região incisora.

Partículas encontradas no estômago de indivíduos das espécies *Eueides aliphera*, *Dryas iulia*, *Philaethria wernickei*, *Dione juno* e *Agraulis vanillae* apresentaram um formato mais homogêneo entre si, sendo um extremo arredondado e o outro quase reto quanto ao tipo de corte, quando comparadas com os formatos irregulares exibidos pelas partículas das espécies *Heliconius ethila*, *Laparus doris*, *Heliconius erato*, *Heliconius sara* e *Heliconius charithonia* (Fig. 3). No que se refere ao tamanho de ditas partículas, existiu uma tendência de separação em dois grupos: Indivíduos de espécies mais

derivadas *H. ethila*, *Laparus doris*, *H. erato* e *H. sara* (exceto *H. charithonia*) apresentaram partículas significativamente maiores que as espécies menos derivadas *Eueides aliphera*, *Dryadula phaetusa*, *Philaethria wernickei*, *Dione juno* e *Agraulis vanillae* (exceto *Dryas iulia*), sendo *Eueides aliphera* considerada como a espécie com partículas de menor tamanho dentro do grupo inteiro (Fig. 4). De forma geral, o tamanho das partículas encontradas no estômago dos indivíduos exibiu baixa relação com tamanho mandibular dos mesmos; muitos indivíduos (espécies) com mandíbulas pequenas apresentaram partículas grandes e vice-versa (Fig. 5).

### 3.2 Mandíbulas na ontogenia de Heliconiini

Houve diferenças entre o tamanho do centroide mandibular das espécies (ANOVA,  $F=16.39$ ,  $p<0,001$ ,  $n=90$ ). Tal variação esteve associada ao tamanho dos adultos de cada espécie (Fig. 6). O crescimento no tamanho mandibular, em todos os casos, se ajustou a um modelo exponencial (Fig. 7) ajustado a uma reta por regressão linear ( $r^2>0,75$ ). Em todas as espécies houve um crescimento alométrico positivo da mandíbula em relação com a cápsula cefálica (Fig. 8) e se obtiveram diferenças estatísticas significativas entre as inclinações de ditas retas de crescimento em todas as espécies (Tabela 2).

Como mencionado anteriormente, a forma da mandíbula apresentou porcentagens de classificação corretas iguais ou superiores a 75% para todos os instares em todas as espécies, indicando que a forma da estrutura variou fortemente ao longo da ontogênese (S3 Material suplementar); variação de forma que foi significativamente maior no último instar (MANOVA,  $F=4.0018$ ,  $p<0,001$ ,  $n=90$ ) quando comparado com o primeiro instar (MANOVA,  $F=7.2629$ ,  $p<0,001$ ,  $n=81$ ).

### 3.3 Mandíbulas na filogenia de Heliconiini

A análise de componentes principais (PCA) da forma mandibular mostrou agrupamentos (espécies) melhor definidos no primeiro instar, em contraste com o quinto, onde apresentou-se uma tendência à convergência entre grupos (Fig. 9).

A árvore filogenética reconstruída pelo método Bayesiano (Fig. 10<sup>a</sup>) revelou uma topologia que corrobora as relações inferidas por Beltrán et al. (2007) e Massardo et al. (2015). *Heliconius* apresentou um clado monofilético bem suportado (agrupando *H. charithonia*, *H. erato phyllis*, *H. sara*, *H. ethilla* e *Laparus*). Este último em particular já vem sendo situado dentro do clado de *Heliconius* com base em inferências recentes (Kozak et al. 2014; Massardo et al. 2015), e proximamente relacionado à *E. aliphera*, em concordância com as hipóteses moleculares prévias (Brown 1981; Brower e Egan 1997, Beltrán et al. 2007). A topologia indica relação fortemente suportada de *A. vanillae* com *D. junonia* e de um clado formado por *Dryas iulia*+*Dryadula phaetusa*, relacionado a *Philaethria wernickei*, embora as relações das duas primeiras com a terceira não sejam tão suportadas. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Beltrán et al. (2007) e Kozak et al. (2014).

A árvore de distâncias fenotípicas geradas para forma mandibular do primeiro instar (Fig. 10B) mostra o agrupamento entre espécies de 4 subgrupos: *Dione junonia*+*Agraulis vanillae*, (*Laparus doris* + (*H. sara* +*H. erato* +*H. charithonia* +*Eueides aliphera* +*H. ethilla*+*Dryas*), *Dryadula phaetusa* e *Philaethria wernickei*. A árvore fenotípica gerada para o quinto instar (Fig. 10C) mostrou uma topologia diferente da obtida para primeiro instar, com 3 agrupamentos distinguíveis: (*H. charithonia*+*Agraulis vanillae*) + (*H. ethilla*+*Eueides aliphera*) + (*Laparus*+*Dione*) + *H. sara* + *H. erato*, *Dryas iulia* e *Philaethria wernickei* +*Dryadula phaetusa*.

As distâncias calculadas a partir do número de diferenças entre sequências pareadas (DG) são apresentadas na Tabela 3 e as matrizes de distância fenotípicas de Mahalanobis de primeiro e quinto instar na Tabela 4. Nenhuma das duas matrizes morfológicas apresentou correlação significativa com a matriz DG; a correlação entre a matriz de distância morfológica de primeiro instar (L1) *versus* DG apresentou  $r = 0.17$  ( $p = 0.42$ ) e entre o quinto instar (L5) *versus* DG.  $R = 0.34$  ( $p = 0.11$ ).

#### **4. DISCUSSÃO**

As análises alométricas e morfométricas evidenciaram, tanto a nível ontogenético quanto filogenético, que as 11 espécies de heliconíneos estudadas sofreram variações no tamanho e forma das suas mandíbulas. As estruturas mandibulares encontradas sugerem que a maioria das espécies rasgam ou mastigam tecidos no início do desenvolvimento enquanto que no quinto instar, os hábitos alimentares se distinguiram em “raspador”, cortador e o que denominamos “intermediário”, que seriam mandíbulas com características compartilhadas pelos dois hábitos.

##### **4.1 Mandíbulas na ontogenia de Heliconiini**

Frankino (2011) propôs que a evolução fenotípica em animais podia ser estudada “caráter por caráter” que sugere que o corpo dos seres vivos é composto de unidades integradas localmente. Adicionalmente, estas unidades poderiam ser consideradas partes modulares que integram caracteres funcionalmente relacionados em unidades de transformação evolutiva que surgem espontaneamente ou como produto da seleção natural.

As variações encontradas no tamanho da mandíbula dos heliconíneos estudados foram congruentes com a teoria que afirma que as relações de crescimento entre partes do corpo de um indivíduo geralmente variam de acordo com seu tamanho (Nijouth e

German 2012); apresentando normalmente pouca variação intraespecífica e ampla variação interespecífica (Frankino et al. 2011). Os tamanhos da mandíbula corresponderam com o tamanho intrínseco da envergadura da asa atribuída às espécies. Por exemplo, *L. doris*, *H. erato*, *D. phaetusa* e *P. wernickei* são espécies que naturalmente possuem indivíduos de maior porte quando comparados com *D. juno* e *E. aliphera*. Como consequência, as quatro primeiras foram as espécies cujos indivíduos apresentaram mandíbulas maiores, enquanto as duas últimas apresentaram mandíbulas menores. Adicionalmente, o conteúdo estomacal de indivíduos (espécies) com mandíbulas pequenas exibiram partículas grandes (e vice-versa); sugerindo, de forma inédita, que o tamanho das partículas no estômago das lagartas dessas borboletas estaria determinada pela forma da mandíbula e não pelo seu tamanho.

Durante a ontogênese das onze espécies de heliconíneos estudadas observou-se uma relação alométrica positiva entre a taxa de crescimento da mandíbula e a cápsula cefálica de larvas. No referente a crescimento cefálico diferencial, o resultado é congruente com as variações alométricas encontradas por Aymone (2006) em *Heliconius erato phyllis*, onde a cabeça cresceu proporcionalmente mais que a mandíbula. A autora correlacionou esse crescimento diferenciado da região cefálica com os requerimentos mecânicos das estruturas alimentares (mandíbula e músculo adutor) frente ao aumento da rigidez foliar de *P. suberosa*, o principal hospedeiro usado pela espécie. Adicionalmente, nossos resultados permitem corroborar também o proposto por Aymone (2009), de que a constrição da região posterior da cápsula cefálica do primeiro instar de oito espécies de heliconíneos, relativamente à crescente expansão no transcurso da ontogênese, se deve principalmente ao crescimento da estrutura mandibular e sua musculatura alojada na região póstero-dorsal da cabeça das larvas.

A região cefálica dos insetos herbívoros é considerada uma estrutura de vital importância porque alberga o centro de comando do sistema nervoso e as peças bucais (Chittka & Niven 2009; Ito et al. 2014), já tendo sido comprovado para algumas espécies de insetos cortadores que o tamanho da cabeça é determinado pelo tamanho das estruturas alimentares (Das 1937, Bernays 1986, Silveira 2002, Brannen et al. 2005). Bernays (1986), usando lagartas de *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) que foram alimentadas com folhas tenras e rígidas mostrou que o músculo adutor da mandíbula tornou-se mais desenvolvido em indivíduos alimentados com tecidos rígidos, o que conseqüentemente resultou em cápsulas cefálicas maiores quando comparadas com as larvas alimentadas com folhas tenras. Posteriormente, Bernays e Hamai (1987) mostraram para duas espécies de gafanhotos, que a largura da cabeça foi maior quando alimentados com gramíneas mais duras.

Para insetos herbívoros é reconhecido que as características dos hospedeiros, tais como quantidade de micro e macro nutrientes, compostos secundários e dureza do tecido vegetal afetam diretamente a performance dos indivíduos (Bernays e Chapman 1994). A mandíbula de insetos cortadores é a estrutura encarregada de selecionar e processar inicialmente o tipo de tecido que o inseto pode ingerir (Chapman 1998) e portanto está sujeita a pressões ambientais seletivas muito fortes e diretas (e.g. flutuação na disponibilidade de plantas hospedeiras, características diferenciadas e subsequente capacidade de aceitação das mesmas). Um maior investimento no tamanho mandibular estaria diretamente associado a uma otimização e aumento na velocidade do processo de alimentação durante o estágio larval. Por outro lado, as modificações quanto à forma apresentadas pelas mandíbulas estariam sendo moldadas de acordo com as características do hospedeiro do qual as larvas se alimentam (Alexander 1961; Bernays et al. 1991, Bernays 1998).

De forma geral, mudanças de forma dos indivíduos durante a trajetória ontogenética são características que definem as espécies e sua evolução morfológica, pelo menos dentro de um dado filo (Nijouth e German 2012); estruturas alimentares durante a ontogênese de insetos se modificam não só quanto ao tamanho, mas também quanto à forma em si (Matsuda 1965, Gorb & Beutel 2000, Bernays e Janzen 1988, Brannen et al. 2005). As análises de componentes principais junto com as deformações “Thin Plate Splines” realizadas para cada espécie mostraram a forma mandibular do primeiro instar fortemente diferenciada em relação aos demais instares e que essa diferenciação se torna menos evidente em instares subsequentes, o que pode estar relacionado com a alta especificidade apresentada por larvas jovens ao hospedeiro vegetal, que geralmente diminui progressivamente durante a ontogênese (Bernays 1987, Zalucki et al 2002).

Em relação a dita especificidade em larvas jovens, trabalhos de Silveira (2002) e Elpino-Campos (2010) evidenciaram um alto grau de desgaste e danos ocorridos nas mandíbulas de larvas de *H. erato* em relação ao aumento da idade (rigidez) das folhas oferecidas para alimentação. Silveira (2002) argumentou que o alto desgaste apresentado por larvas de instares iniciais da espécie em questão, alimentadas em folhas velhas (condição forçada), deveu-se principalmente à morfologia mandibular própria do primeiro instar; que apresenta dentes pontiagudos com a região posterior conspícua. Supostamente, esta mandíbula seria adaptada para a mastigação de tecidos jovens (condição natural), limitando alimentação em tecidos duros e espessos. Uma “identidade de forma” particular em larvas de instares iniciais, de acordo com o tipo de tecido consumido, explicaria a separação dos primeiros instares em indivíduos de *H. erato* encontrados aqui, e igualmente nas outras 10 espécies estudadas nesse trabalho, o que será explorado em detalhe, a seguir.

#### 4.2 Mandíbulas na filogenia de Heliconiini

A convergência de padrões alométricos entre espécies relacionadas resultaria de seleção externa agindo fortemente sobre estruturas que favorecem o êxito durante o desenvolvimento embrionário até o estado adulto (Wagner 1996). Em insetos holometábolos, o êxito da etapa adulta depende do desempenho dos estágios imaturos, que se alimentam ativamente, e portanto, estruturas mandibulares desempenham um papel crucial no processo (Gilbert e Singer 1975, Gotthard et al. 1994; Bernays 1998; Dmitriew e Rowe 2011). Em todas as espécies, verificou-se uma taxa de crescimento mandibular maior do que a cápsula cefálica durante a trajetória ontogenética, coerente com o encontrado por Aymone (2006) para *H. erato phyllis*. A autora relacionou mandíbulas maiores em instares mais avançados à necessidade de aumento na capacidade de trabalho, devido a pressões seletivas sobre o aparelho bucal, que permitiriam aos indivíduos se alimentar de tecidos dotados de uma maior dureza a medida que transcorre o desenvolvimento.

Por outro lado, mudanças associadas aos hábitos particulares de cada espécie podem levá-las à obtenção de formas específicas que lhes conferiram vantagens no aproveitamento do ambiente (Whitman e Ananthakrishnan 2009) e, dependendo da força das pressões seletivas, podem resultar em diferentes níveis de especificidade (Bernays et al. 1991). Nas análises de componentes principais realizadas para forma mandibular de primeiro e quinto instar identificou-se que espécies mais diferenciadas durante o primeiro instar do que no quinto instar, onde foram corroboradas convergências de forma entre algumas espécies filogeneticamente afastadas. Estes resultados sugerem que pressões ecológicas agiram para induzir convergências evolutivas nas formas mandibulares nos Heliconiini. Ainda, a evolução desta estrutura

estaria ocorrendo por hábitos comuns adotados pelas espécies, como idade da folha ou/egregriedade, sem sinal filogenético agindo no processo.

Devido à pouca capacidade de locomoção, é indispensável que larvas de instares iniciais de insetos se estabeleçam exitosamente nas plantas hospedeiras escolhidas pela fêmea no momento da oviposição, como também é vital alocar energia na forma de biomassa, principalmente porque estados iniciais são os mais vulneráveis e as que apresentam maiores taxas de mortalidade (Bernays 1986, Zalucki et al 2002). O fato das espécies de heliconíneos estudados terem apresentado uma maior diferenciação de forma mandibular durante o primeiro instar pode estar relacionado características particulares de cada espécie, que lhes permitiram explorar eficientemente o hospedeiro utilizado pela fêmea durante sua história evolutiva. Nesse caso, sendo hospedeiros diferentes, as larvas de primeiro instar seriam também diferenciadas umas das outras e, portanto, apresentariam características mais discrepantes entre as espécies do que larvas de quinto instar, nas quais tem sido corroborada uma maior flexibilidade no aproveitamento de hospedeiros alternativos, que originaria então convergências morfológicas entre grupos com hábitos ‘flexíveis’. Um exemplo disso seria o estudo realizado por Rodrigues e Moreira (1999), onde larvas de quinto instar de *H. erato phyllis* conseguiram se alimentar exitosamente de tecidos tenros e duros do hospedeiro, a diferença das larvas de primeiro instar que, quando condicionadas a folhas velhas, mostraram uma alta mortalidade.

Alexander (1961), durante o quinto instar, atribuiu as larvas do gênero *Eueides* o hábito “raspador” por elas não possuírem crestas nem cúspides pronunciadas na região incisora e uma região molar aplanada (que não foi corroborada nesse trabalho), diferente do gênero *Heliconius*, grupo aparentemente cortador, cujas larvas se alimentam de toda a folha, ingerindo tanto a borda como a nervura central.

Adicionalmente, a autora propõe que larvas de *D. juno*, embora possuam dentes com cúspides diferenciadas e região molar sobressalientes e dentes amplos e separados teriam mandíbulas menos eficientes do que as apresentadas por *Heliconius*. O hábito larval de *Dione*, rejeitando sempre a nervura central da folha, evidência o empecilho desse grupo para consumir tecidos rígidos. Portanto, possuiria também um tipo de hábito “raspador”. A topologia de forma mandibular do primeiro e quinto instares das espécies não foram congruentes entre si e nem com a topologia filogenética do grupo. Para o quinto instar verificou-se convergências morfológicas entre espécies filogeneticamente afastadas; sendo mais evidente o caso de *D. juno* e *L. doris*. Embora essas espécies apresentam dentes com cúspides e região molar definidas durante o quinto instar, os dentes foram notavelmente amplos. Filogeneticamente esses dois grupos divergem; *D. juno* é considerada uma espécie mais basal, enquanto *L. doris*, uma espécie mais derivada, aparentada (e muitas vezes inclusa) com o grupo *Heliconius*. Por outro lado, *Dione* e *Laparus* são gêneros cujos indivíduos apresentam hábito gregário, o que de alguma forma poderia explicar a morfologia mandibular convergente dessas espécies.

A gregariedade surgiu independentemente pelos menos três vezes em Heliconiini (Benson et al. 1975, Beltran et al. 2007) e tem sido proposta como um fenômeno que evoluiu em função da sobrevivência das espécies que apresentam o comportamento. Trabalhos realizados por Bianchi e Moreira (2005) a respeito da performance de *D. juno* criadas em *Passiflora edulis* mostraram que altas densidades larvais aumentam a sobrevivência por uma suposta “facilitação alimentar” relacionada com aspectos “meramente comportamentais”, inerentes ao hábito gregário. Estudos preliminares realizados por Millan (em preparação) mostraram resultados similares para indivíduos da espécie *L. doris* criada em *P. maliformis*.

A convergência da forma mandibular de *D. juno* e *L. doris* no quinto instar, contrário ao proposto por Bianchi e Moreira (2005), evidência alterações ontogenéticas de natureza morfológica (e não só comportamentais) compartilhadas entre indivíduos das duas espécies, que seriam causadas, possivelmente, pelo seu hábito gregário (alimentação em grupo). Quando comparadas as mandíbulas de quinto instar de *L. doris* com suas espécies irmãs mais próximas (*H. ethila*, *H. erato*, *H. sara* e *H. charithonia*) é evidente que os dentes de indivíduos de *L. doris* são muito mais amplos e grossos e a região molar muito menos ornamentada do que a região molar das mandíbulas cortadores das *Heliconius*. Ao mesmo tempo, *L. doris* apresenta muitas similaridades com a mandíbula de *D. juno*, que possui hábito raspador.

Em outras palavras, *L. doris* e *D. juno*, sendo espécies afastadas filogeneticamente, compartilham o hábito raspador durante o quinto instar, que poderia ter sido estimulado pelo hábito estritamente gregário em etapas iniciais do desenvolvimento. Levando em conta que tanto *Dione* como *Laparus* são gêneros que apresentam oviposição em massa (15 a 64 ovos por evento de postura), seria coerente depositar ovos em folhas extensas e totalmente abertas para garantir alimento suficiente para toda a prole. Nesta situação, um hábito meramente cortador seria ineficiente para consumir tecidos duros característicos de folhas mais maduras, explicando assim a convergência morfológica mandibular raspadora.

O fenômeno de ‘facilitação alimentar’ observado em espécies gregárias é um assunto pouco explorado. Nosso estudo com os resultados obtidos por Bianchi e Moreira (2005) sugerem que larvas de primeiro instar de ambas as espécies não sobrevivem quando criadas separadamente, o que indica que larvas jovens são ineficientes se alimentando sozinhas de tecidos vegetais duros. Esta hipótese é corroborada pela morfologia exibida pelo primeiro instar das duas espécies, que é

basicamente “cortadora” (ao igual que os *Heliconius*) e se torna raspadora no transcurso da ontogenia. Evidenciamos morfologicamente que o hábito raspador se desenvolve nas larvas depois do primeiro instar e que só a condição “agregada” permite a alimentação de larvas de primeiro instar em folhas rígidas, pois sem essa condição a mortalidade aumenta significativamente.

No caso de indivíduos de *Heliconius*, a condição “cortadora” foi mantida até o fim do desenvolvimento em todas as espécies estudadas; embora existam condições de semi-gregriedade dentro do grupo (*H. sara* e *H. charithonia*), dita condição parece não influenciar mudanças ontogenéticas nas mandíbulas dos indivíduos. Espécies de *Heliconius* colocam seus ovos nas gavinhas, primeira folha fechada e folhas mais novas da planta hospedeira que são mais tenras e portanto, larvas cortadoras jovens, sozinhas, conseguem se alimentar desses tecidos moles. A transição de uma condição mandibular “cortadora” a uma raspadora em indivíduos de instares mais avançados de *D. juno* e *L. doris* é uma questão que de alguma forma favoreceria a vida em grupo. As razões dessa mudança na dinâmica dessas espécies restam a serem exploradas.

Segundo Aymone (2009), as variações de forma da cápsula cefálica de oito espécies de heliconíneos não correlacionadas com a filogenia das mesmas indicaria processos evolutivos independentes selecionados por restrições ontogenéticas e ecológicas relativas a adaptações nas peças bucais. A forma das mandíbulas de *D. phaetusa* e *P. wernickei* estiveram fortemente separadas das outras espécies logo no primeiro instar e apresentaram uma alta convergência no quinto instar. Desde o primeiro instar, apresentou-se um achatamento e/ou ausência dos dentes 11 e 13 da região incisora nas duas espécies, os quais foram conspícuos nas outras nove espécies de heliconíneos estudadas.

Os gêneros *Philaethria* e *Dryadula* não apresentam hábito gregário e são reconhecidos por possuir uma alta capacidade de consumo de folhas maduras desde instares iniciais até o fim da etapa larval (Benson et al. 1975). É factível que o agrupamento da forma mandibular entre as espécies desses dois gêneros corresponda então a uma convergência de hábito alimentar associada à “idade de folha”, que capacita larvas para o consumo de folhas velhas desde o início do desenvolvimento. Devido a isso, a existência de diferenciação evidente dessas duas espécies no primeiro instar, onde foi observado a presença de regiões incisoras lisas e regiões molares aplanadas, capazes de processar folhas velhas. Esse tipo de mandíbula “raspa” os tecidos rígidos das folhas maduras permitindo sua ingestão (Alexander 1961). Tal aspecto poderia ser estendido às mandíbulas de *E. aliphera* onde também foi corroborada uma região incisora lisa própria de espécies que lidam com folhas velhas mas, diferentemente de espécies meramente raspadoras, possui também áreas molares desenvolvidas parecidas com as das espécies de *Heliconius*, que são cortadoras. *Eueides aliphera* seria uma espécie com mandíbulas “intermediárias” capazes de “escavar” tecidos vegetais duros, contando com a região molar pronunciada, que auxiliaria na fragmentação de tecidos rígidos próprios de folhas velhas.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo é a primeira e mais completa evidência experimental sobre o crescimento aprimorado da mandíbula em representantes das principais linhagens de lepidópteros heliconíneos. É o primeiro que mostra em detalhe a ocorrência de mudanças de forma na mandíbula durante a ontogênese dos indivíduos.

Adicionalmente, evidenciamos convergências de forma mandibular entre espécies filogeneticamente afastadas como resposta a tipos de hábitos alimentares

compartilhados (idade da folha consumida ou alimentação em grupo), correspondendo principalmente à necessidade primária de sobrevivência larval.

São necessários estudos adicionais com espécies gregárias (ex. *D. juno* e *L. doris*) em comparação àquelas de hábitos bem estabelecidos quanto à “idade de folha” (e.g. *H. erato*), que determine os processos envolvidos nas mudanças e as consequências desses hábitos sobre o tamanho e forma de outras estruturas alimentares (e.g. musculatura correspondente). Da mesma forma, sugere-se a condução de estudos que testem a plasticidade fenotípica da mandíbula frente ao consumo de diferentes espécies passifloráceas e em espécies de hábito oligófago (e.g. *H. erato* e *D. iulia*, entre outras).

## 6. AGRADECIMENTOS

Ao centro de microscopia eletrônica da UFRGS (CME) pelo uso dos equipamentos. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado concedida para a realização desse estudo. Aos revisores do artigo pelas suas sugestões para o melhoramento do mesmo.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexander, A.J., 1961. A study of the biology and behavior of the caterpillars, pupae and emerging butterflies of the subfamily Heliconiinae in Trinidad, West Indies. Part I. Some aspects of larval behavior. *Zoologica* 46, 1-24.
- Aymone, A.C., 2006. Alometria cefálica na ontogênese de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 37p.

- Aymone, A.C., 2009. Restrições ontogenéticas na evolução da forma da cápsula cefálica em oito espécies de heliconíneos (Lepidoptera: Nymphalidae). Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 107p.
- Adams, D.C., Rosenberg M.S., 1998. Partial warps, phylogeny, and ontogeny: a comment on Fink and Zelditch (1995). *Systematic Biology* 47, 168–173.
- Beltrán, M., Jiggins, C.D., Brower, A.V.Z., Bermingham, E. and Mallet, J., 2007. Do pollen feeding, pupal-matting 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.
- Bernays, E.A., 1986. Diet Induced head allometry among Foliage Chewing insects and its importance for graminivores. *Science* 231 (4737), 495-497.
- Bernays, E.A. and Hamai, J., 1987. Head size and shape in relation to grass feeding in Acridoidea (Orthoptera). *Journal of Insect Morphology & Embryology* 16, 323-330.
- Bernays, E.A. and Janzen, D.H., 1988. Saturniid and Sphingid caterpillars: Two ways to eat leaves. *Ecology* 69 (4), 1153-1160.
- Bernays, E.A., Jarzembowski, E.A. and Malcom, S.B., 1991. Evolution of insect Morphology in Relation to plants (and discussion). *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 333, 257-264.
- Bernays, E.A. and Chapman, R.F., 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York. 312p.
- Bernays, E.A., 1998. Evolution of feeding behavior in insect herbivores. *BioScience* 48, 35–44.

- Bianchi, V. and Moreira, G.R.P., 2005. Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 22, 43-50.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. and Drummond, A.J., 2014. Beast 2: A software platform for 36epidopt evolutionary analysis. *PloS computational biology* 10, e1003537.
- Brannen, D., Barman, E.H. and Wall, W.P., 2005. An allometric analysis of ontogenetic changes (variation) in the cranial Morphology of larvae of *Agabus 36epidoptera36s* (Crotch) (Coleoptera: Dytiscidae). *The Coleopterists Bulletin* 59(3), 351-360.
- Brower, A.V.Z. and Egan, M.G., 1997. Cladistic analysis of *Heliconius* butterflies and relatives (Nymphalidae: Heliconiiti): a revised phylogenetic position for *Eueides* based on sequences from mtDNA and a nuclear gene. *Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences* 264, 969–977.
- Brown, K.S, 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual review of Entomology, Stanford* 26, 427-456.
- Chapman, R.F., 1964. The structure and wear of mandibles in some African grasshoppers. *Proceedings of the Zoological Society of London* 142 (1), 107-121.
- Chapman, R.F., 1998. *The insects: structure and function*. Harvard Univesity Press, Cambridge. 919p.
- Chittka, L., Niven, J., 2009. Are bigger brains better? *Current Biology* 19, 995–1008.
- Das, G.M., 1937. The musculature of the mouth-parths of insect larvae. *Quartely Journal of microscopical Science* 80, 39-80.

- Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Djain, A. and Pathak, M.D., 1967. Role of silica in resistance to 37epidop rice borer, *Chilo suppressalis* (Walker), in rice varieties. *Journal of Economic Entomology* 60, 347-351.
- Dmitriew, C. and Rowe, L., 2011. The effects of larval nutrition on reproductive performance in a food-limited adult environment. *PLoS ONE* 6(3), e17399. Doi:10.1371/journal.pone.0017399.
- Elpino-Campos, A., 2010. Características da planta hospedeira, ontogênese e comportamento alimentar de larvas de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Nymphalidae) Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 122p.
- Ferro, V.G., 1998. Criação de *Heliconius erato 37epidop* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) em condições semi-naturais. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 49p.
- Frankino, A.W., Zwaan, B.J., Stern, D.L. and Brakefield, P.M., 2011. Natural selection and developmental constraints in the evolution of allometries. *Science* 307(5710), 718–720.
- Gilbert, L.E. and Singer, M.C., 1975. Butterfly ecology. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* 6, 365–397.
- Gorb, S. and Beutel, R.G., 2000. Head capsule design and mandible control in beetle larvae: a three dimensional approach. *Journal of Morphology* 244, 1-14.

- Gotthard, K., Nylin, S. and Wiklund, C., 1994. Adaptive variation in growth rate: life history costs and consequences in the speckled 38epi butterfly, *Pararge aegeria*. *Oecologia* 99, 281–289.
- Iseley, F.B., 1944. Correlation between mandibular morphology and food specificity in grasshoppers. *Annals of the Entomological Society of America* 37, 47-67.
- Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, J.D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L.L., Rössler, W., Simpson, J.H., Strausfeld, N.J. and Strauss, R., Vosshall, L.B., 2014. A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron* 81(4), 755-65.
- Kozak, M.K., Wahlberg, N., Neild, A., Dasmahapatra, K.K., Mallet, J. and Jiggins, C.D., 2014. Multilocus species trees show the recent adaptive radiation of the mimetic *Heliconius* butterflies. *Systematic Biology*, doi: 10.1093/sysbio/syv007.
- Mahalanobis, P. C., 1936. On the generalized distance in statistics. *Proceedings of the National Institute of Science of India* 12, 49–55.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.
- Massardo, D., Fornel, R., Kronforst, M., Gonçalves, G.L. and Moreira, R.P.G., 2015. Diversification of the silverspot butterflies (Nymphalidae) in the Neotropics inferred from multi-locus DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82, 156–165.
- Matsuda, R., 1965. Morphology and evolution of the insects head. *Memoirs of the American Entomological Institute, Ann Arbor* 4, 1-34.

- Millan, C., Borges, S.S., Rodrigues, D. and Moreira, G.R.P., 2013. Behavioral and life-history evidence for interspecific competition in the larvae of two heliconian butterflies. *Naturwissenschaften* 100(10), 901-11.
- Nijhout, H.F., 2008. Development phenotypic landscapes. *Evolutionary biology* 35, 100-103.
- Nijhout, H.F. and German, R.Z., 2012. Developmental causes of allometry: New models and implications for phenotypic plasticity and evolution. *Integrative and comparative biology* 52, 43–52.
- Penz, C.M., 1999. Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society* 127, 277-344.
- Périco, E. and Araujo, A. M., 1995. Interação entre 39epido espécies de Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) e suas plantas hospedeiras (Passifloraceae) em uma floresta secundária do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 3, 3-18.
- Posada, D., 2008. JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253–1256.
- Rausher, M.D., 1981. Host plant selection by *Battus philenor* butterflies: The roles for predation, nutrition, and plant chemistry. *Ecological monographs* 51, 1-20.
- Raupp, M.J., 1985. Effects of leaf toughness on mandibular wear of the leaf beetle, *Plagioderma versicolora*. *Ecological Entomology* 10, 73–79.
- Rodrigues, D. and Moreira, G.R.P., 1999. Feeding preference of *Heliconius erato* 39epidop (Lepidoptera, Nymphalidae) in relation to leaf and consequences for larval performance. *Journal of the Lepidopterists Society* 53, 108-113.
- Rohlf, F. J. and Slice, D., 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39, 40-59.

- Rohlf, F.J., 1996. Program TpsUtil, 40epidop 1.38. Stony Brook: State University of New York, Department of Ecology and Evolution.
- Rohlf, F. J., 2006. A comment on “phylogenetic correction”. *Evolution* 60, 1509-1515.
- Rohlf, F.J., 2010. TpsDig, version 2.16, Stony Brook: State University of New York, Department of Ecology and Evolution. Available at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 9, 945-967.
- Scoble, M.J., 1992. *The Lepidoptera form, function and diversity*. Oxford University Press, New York. 404p.
- Silva, A.K., Gonçalves, L.G. and Moreira, G.R.P., 2014. Larval feeding choices in heliconians: induced preferences are not constrained by performance and host plant phylogeny. *Animal Behaviour* 89, 155-162.
- Silveira, M.A.P.A., 2002. *Variação da dureza da folha em Passiflora, efeito no desgaste das mandíbulas de Heliconius erato phyllis (Lepidoptera: Nymphalidae) e consequências sobre a herbivoria*. Porto Alegre, Dissertação de Mestrado em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 44p.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Tamura, K. and Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512-526.
- Wagner, G.P., 1996. Homologues, Natural Kinds and the Evolution of Modularity. *American Zoologist* 36, 36-43.

- Walker, G.P., 1985. Stylet penetration by the bayberry whitefly, as affected by leaf age in lemon, *Citrus iimon*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 39, 115-121.
- Wallin, H., 1988. Mandible wear in the carabid beetle *Pterostichus melanarius* in relation to diet and burrowing behaviour. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 48, 43–50.
- Weihmann, T., Kleinteich, T., Gorb, S.N. and Wipfler, B., 2015. Functional morphology of the mandibular apparatus in the cockroach *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) – a model species for omnivore insects. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 73 (3), 477-488.
- Whitman, W.W. and Ananthakrishnan, T.N., 2009. Phenotypic plasticity of insects. Mechanisms and consequences. Science Publishers, United States of America. 894p.
- Zalucki, M.P., Clarke, A.R. and Malcolm, S.B., 2002. Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annual Review Entomology* 47, 361–393.

**Tabela 1.** Descrição morfológica das mandíbulas de primeiro e quinto instares de onze espécies de heliconíneos.

Espécie	Grau gregariedade	Instar	
		L1	L5
<i>Heliconius ethila</i>	Solitária	<p>6 dentes conspícuos na região incisora. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).</p> <p>HABITO: CORTADOR<sup>1</sup></p> <p>Tipo folhas: Novas</p>	<p>Mandíbula aplanada. Dentes conspícuos na região incisora. Formação de superfície aplanada entre os dentes localizados nos landmarks 7 e 9 da região incisora. Região molar engrossada e elevada, apresentando crestas e pequenos dentes na superfície. Se observam ornamentações assemelhando escamas na superfície interna da mandíbula.</p> <p>HÁBITO: CORTADOR FRACCIONADOR<sup>2</sup></p> <p>Tipo folha: Novas e velhas</p> <p>Tamanho das partículas no estômago: Grandes Formato das partículas: Irregular</p>
		<p>6 dentes conspícuos na região incisora. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).</p>	<p>Mandíbula côncava. Dentes conspícuos e amplos (aplanados) na região incisora. Região molar pouco</p>

<i>Laparus doris</i>	Gregária	<p>HABITO: CORTADOR Tipo de folhas: Novas e maduras</p>	<p>desenvolvida, dando a aparência de colher, reforçada pela superfície continua formada entre os dentes localizados nos landmarks 7 e 9, assemelhando a borda de uma espátula. Se observam ornamentações assemelhando escamas na superfície interna da mandíbula.</p> <p>HÁBITO: RASPADOR<sup>3</sup></p> <p>Tipo folhas: Novas e velhas</p> <p>Tamanho das partículas no estômago: Grandes Formato das partículas: Irregular</p>
<i>Heliconius erato</i>	Solitária	<p>6 dentes conspícuos na região incisora. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).</p> <p>HABITO: CORTADOR Tipo de folhas: Novas</p>	<p>Mandíbula aplanada. Dentes conspícuos na região incisora. Formação de superfície aplanada entre os dentes localizados nos landmarks 7 e 9 da região incisora. Região molar fortemente elevada, apresentando crestas e tubérculos longos ao parecer fusionados e fortemente erguidos na superfície, em direção à região incisora.</p> <p>HÁBITO: CORTADOR FRACCIONADOR</p> <p>Tipo folhas: Novas e velhas</p> <p>Tamanho das partículas no estômago: Grandes Formato das partículas: Irregular</p>
<i>Heliconius sara</i>	Semi-gregária	<p>6 dentes conspícuos na região incisora. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).</p>	<p>Mandíbula aplanada. Dentes conspícuos na região incisora. Formação superfície aplanada entre os dentes</p>

Grau de gregariedade: Semi-gregária	HABITO: CORTADOR Tipo de folhas: Novas	localizados nos landmarks 7 e 9 da região incisora. Região molar fortemente elevada, apresentando crestas e tubérculos longos ao parecer fusionados e fortemente erguidos na superfície, em direção à região incisora.  HÁBITO: CORTADOR FRACCIONADOR  Tipo folhas: Novas e velhas  Tamanho das partículas no estômago: Grandes Formato das partículas: Irregular
<i>H. charithonia</i> Grau de gregariedade: Semi-gregária	Semi-gregária	6 dentes conspícuos na região incisora. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).  HABITO: CORTADOR Tipo de folhas: Novas  Mandíbula aplanada. Dentes conspícuos na região incisora. Formação superfície aplanada entre os dentes localizados nos landmarks 7 e 9 da região incisora. Região molar desenvolvida. Se observam ornamentações assemelhando escamas na superfície interna da mandíbula  HÁBITO: CORTADOR FRACCIONADOR  Tipo folhas: Novas e velhas  Tamanho das partículas no estômago: Pequenas Formato das partículas: Irregular
<i>Eueides aliphera</i>	Solitária	6 dentes conspícuos na região incisora. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).  Mandíbula aplanada. Dentes aplanados pouco desenvolvidos sendo o dente localizado no landmark 9 reduzido, o que forma uma superfície

		<p>HABITO: CORTADOR Tipo de folhas: Novas</p>	<p>continua assemelhando a borda de uma espátula. Região molar bem desenvolvida com tubérculos na superfície.</p> <p>HÁBITO: ESCAVADOR<sup>4</sup>, “INTERMEDIARIO”</p> <p>Tipo folhas: Velhas</p> <p>Tamanho das partículas no estômago: Pequenas Formato das partículas: Arredondado</p>
<i>Dryas iulia</i>	Solitária	<p>6 dentes conspícuos na região incisora. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).</p> <p>HABITO: CORTADOR Tipo de folhas: Velhas</p>	<p>Mandíbula aplanada. Engrossamento evidente dos dentes na região incisora, como a elevação da área basal dos dentes, entre os dentes e a região molar que é pouco desenvolvida, e desprovida de dentes e tubérculos na superfície.</p> <p>HÁBITO: RASPADOR</p> <p>Tipo folhas: Velhas</p> <p>Tamanho das partículas no estômago: Grandes Formato das partículas: Arredondado</p>
<i>Dryadula phaetusa</i>	Solitária	<p>Mandíbula achatada. 6 dentes conspícuos na região incisora, curvados em direção à região molar RM pouco desenvolvida (praticamente lisa).</p> <p>HABITO: RASPADOR Tipo de folhas: Velhas</p>	<p>Mandíbula côncava semelhante a uma concha. Superfície continua formada entre os dentes localizados nos landmarks 7 a 11 da região incisora, parecendo a borda de uma espátula. Dentes correspondentes aos landmarks 9, 11 e 13 da região incisora fortemente achatados. Área molar desenvolvida, elevada, sem ornamentações ou tubérculos na superfície.</p>

---

			<p>HÁBITO: RASPADOR</p> <p>Tipo folhas: Velhas</p> <p>Tamanho das partículas no estômago: Pequenas Formato das partículas: Arredondado</p>
--	--	--	--

---

<i>Philaethria wernickei</i>	Solitária	<p>Mandíbula aplanada. 6 dentes na região incisora, sendo o 7, 15 e 17 conspícuos e o dente 9 e 11 reduzidos. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa)</p> <p>HÁBITO: RASPADOR Tipo folhas: Velhas</p>	<p>Mandíbula côncava. Dente localizado no landmark 9 ausente (devido a fusão com sua respectiva incisão ponto anatômico 10) e o dente 11 fortemente achatado na região incisora. Região molar pouco desenvolvida, favorecendo o aspecto de concha, reforçado pela superfície continua formada entre os dentes localizados nos landmarks 7 a 11, parecendo a borda de uma espátula.</p> <p>HÁBITO: RASPADOR</p> <p>Tipo folhas: Velhas</p> <p>Tamanho das partículas no estômago: Pequenas Formato das partículas: Arredondado</p>
------------------------------	-----------	---	---

---

<i>Dione juno</i>	Gregária	<p>6 dentes conspícuos e afiados na região incisora, na direção oposta à região molar. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).</p> <p>HÁBITO: CORTADOR Tipo folhas: Velhas</p>	<p>Mandíbula aplanada. Dentes conspícuos e amplos (aplanados) na região incisora. Região molar desenvolvida e elevada, com pequenos dentes na superfície.</p> <p>HÁBITO: RASPADOR</p> <p>Tipo folhas: Velhas</p> <p>Tamanho das partículas no estômago: Pequenas Formato das partículas: Arredondado</p>
-------------------	----------	---	--

---

---

<i>Agraulis vanillae</i>	Solitária	6 dentes conspícuos na região incisora. Região molar pouco desenvolvida (praticamente lisa).  HABITO: CORTADOR Tipo folhas: Velhas	Mandíbula aplanada. Dentes na região incisora conspícuos, com elevação da região basal entre os dentes e a região molar, que é desenvolvida com poucos tubérculos na superfície.  HÁBITO: RASPADOR  Tipo folhas: Velhas  Tamanho das partículas no estômago: Pequenas Formato das partículas: Arredondado
--------------------------	-----------	---	--

---

<sup>1</sup>. Resultado da ação dos dentes;

<sup>2</sup>. Resultado da ação da região molar provida de picos conspícuos;

<sup>3</sup>. Resultado da ação da borda distal mandibular, desprovida de dentes;

<sup>4</sup>. Resultado da ação da região molar em forma globosa, com pouca ornamentação;

**Tabela 2.** Inclinações alométricas ( $\beta$ ) correspondentes ao tamanho da cabeça e tamanho da mandíbula de onze espécies de heliconíneos.

Espécie	$\beta$		F	P	ANCOVA	
	Cápsula cefálica	Centroide mandibular			Diferem as inclinações?	Diferem os interceptos?
<i>Heliconius ethila</i>	0.5524	4.5795	10699.7	< 0.0001	√	-
<i>Laparus doris</i>	0.6788	5.0957	1148.06	< 0.0001	√	-
<i>Heliconius erato</i>	0.5708	5.2203	6739.5	< 0.0001	√	-
<i>Heliconius sara</i>	0.6449	4.5834	16201	< 0.0001	√	-
<i>Heliconius charithonia</i>	0.4107	4.0644	2689.52	< 0.0001	√	-
<i>Eueides aliphera</i>	0.3697	3.4955	5311.51	< 0.0001	√	-
<i>Dryas iulia</i>	0.5807	4.8120	9661.62	< 0.0001	√	-
<i>Dryadula phaetusa</i>	0.5750	6.0129	1717.5	< 0.0001	√	-
<i>Philaethria wernickei</i>	0.5207	4.1901	3380.17	< 0.0001	√	-
<i>Dione junio</i>	0.5068	4.3612	6859.6	< 0.0001	√	-
<i>Agraulis vanillae</i>	0.4898	3.9881	1042	< 0.0001	√	-

**Tabela 3.** Distância genética pareada (Tamura-Nei, 1993) entre 11 espécies de heliconíneos com base em 2836 nucleotídeos, utilizando o método de máxima composição de verossimilhança. Sobrescritos indicam os valores correspondentes às espécies nas colunas.

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Agraulis vanillae</i> <sup>1</sup>										
<i>Dione juno</i> <sup>2</sup>	0,0886									
<i>Dryadula phaetusa</i> <sup>3</sup>	0,0919	0,1120								
<i>Dryas iulia</i> <sup>4</sup>	0,0874	0,1120	0,0832							
<i>Eueides aliphera</i> <sup>5</sup>	0,0844	0,1093	0,1071	0,0998						
<i>Heliconis charithonia</i> <sup>6</sup>	0,0904	0,1209	0,1058	0,0981	0,0823					
<i>Heliconius erato</i> <sup>7</sup>	0,0875	0,1119	0,1039	0,0962	0,0808	0,0514				
<i>Heliconius ethilla</i> <sup>8</sup>	0,0822	0,1059	0,1023	0,0935	0,0816	0,0694	0,0717			
<i>Heliconius sara</i> <sup>9</sup>	0,0915	0,1236	0,1085	0,0981	0,0916	0,0616	0,0605	0,0737		
<i>Laparus doris</i> <sup>10</sup>	0,0952	0,1178	0,1209	0,1033	0,0892	0,0826	0,0786	0,0725	0,0875	
<i>Philaethria wernickei</i> <sup>11</sup>	0,0814	0,1146	0,0960	0,0916	0,0946	0,0974	0,0939	0,0933	0,0964	0,1068

**Tabela 4.** Distâncias fenotípicas de Mahalanobis de primeiro (L1) e quinto instar (L5) entre 11 espécies de heliconíneos. Sobrescritos indicam os valores correspondentes às espécies nas colunas.

L1	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
<i>Agraulis vanillae</i> <sup>1</sup>										
<i>Dione juno</i> <sup>2</sup>	4,4032									
<i>Dryadula phaetusa</i> <sup>3</sup>	133,44	136,00								
<i>Dryas iulia</i> <sup>4</sup>	115,51	117,96	9,325							
<i>Eueides aliphera</i> <sup>5</sup>	149,58	128,11	59,753	39,050						
<i>Heliconis charithonia</i> <sup>6</sup>	84,438	87,919	16,944	6,6372	40,342					
<i>Heliconius erato</i> <sup>7</sup>	64,781	69,21	22,918	17,839	54,224	3,593				
<i>Heliconius ethilla</i> <sup>8</sup>	92,604	100,81	14,928	4,6215	54,117	2,129	7,8330			
<i>Heliconius sara</i> <sup>9</sup>	59,745	64,370	22,482	11,685	49,636	2,315	2,3999	4,38602		
<i>Laparus doris</i> <sup>10</sup>	46,124	51,172	28,690	17,182	63,115	12,73	12,966	12,232	5,4097	
<i>Philaethria wernickei</i> <sup>11</sup>	303,39	310,29	35,898	58,746	128,75	82,386	99,921	73,575	103,54	123,02

L5	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
<i>Agraulis vanillae</i> <sup>1</sup>										
<i>Dione juno</i> <sup>2</sup>	17,266									
<i>Dryadula phaetusa</i> <sup>3</sup>	41,676	50,429								
<i>Dryas iulia</i> <sup>4</sup>	14,253	29,932	21,183							
<i>Eueides aliphera</i> <sup>5</sup>	11,812	16,430	51,214	23,061						
<i>Heliconis charithonia</i> <sup>6</sup>	9,7695	33,310	59,317	35,150	11,588					
<i>Heliconius erato</i> <sup>7</sup>	9,6591	21,637	12,352	11,019	16,359					
<i>Heliconius ethilla</i> <sup>8</sup>	10,696	28,206	44,923	10,256	7,8322	20,113	9,7476			
<i>Heliconius sara</i> <sup>9</sup>	14,138	17,312	26,051	16,839	7,7908	19,169	3,0641	12,209		
<i>Laparus doris</i> <sup>10</sup>	15,342	16,749	36,871	26,138	9,5727	13,654	7,5771	19,031	7,6875	
<i>Philaethria wernickei</i> <sup>11</sup>	53,725	58,806	9,3832	30,945	57,198	73,129	23,964	46,376	27,582	41,761

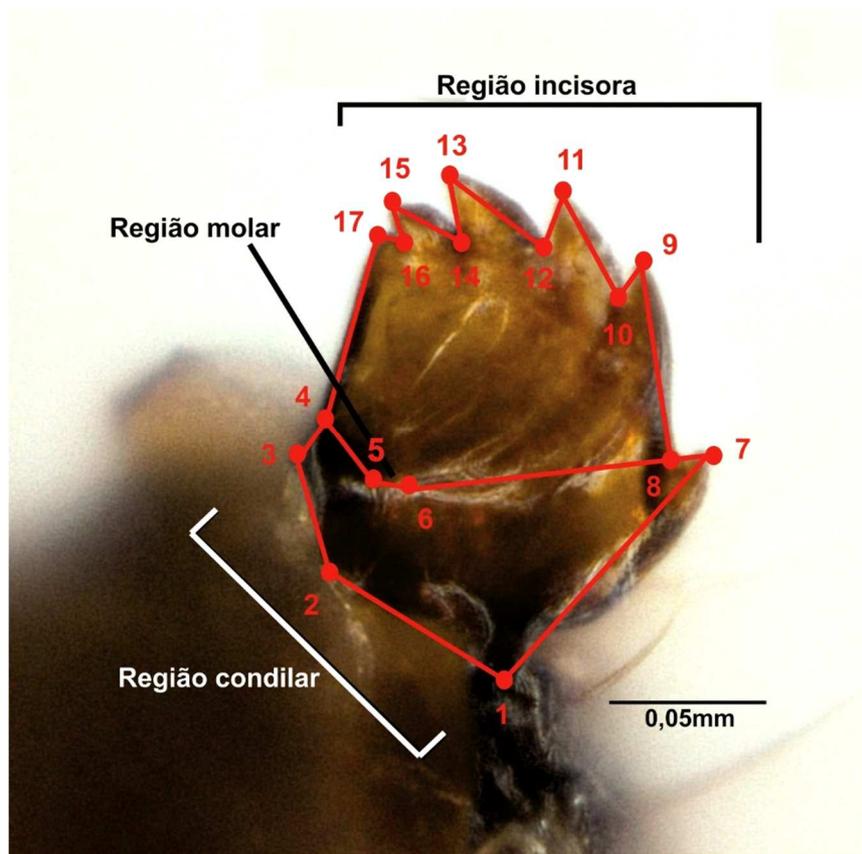
## MATERIAL SUPLEMENTAR

**S1.** Descrição das regiões da mandíbula e respectivos pontos anatômicos utilizados nas análises morfométricas.

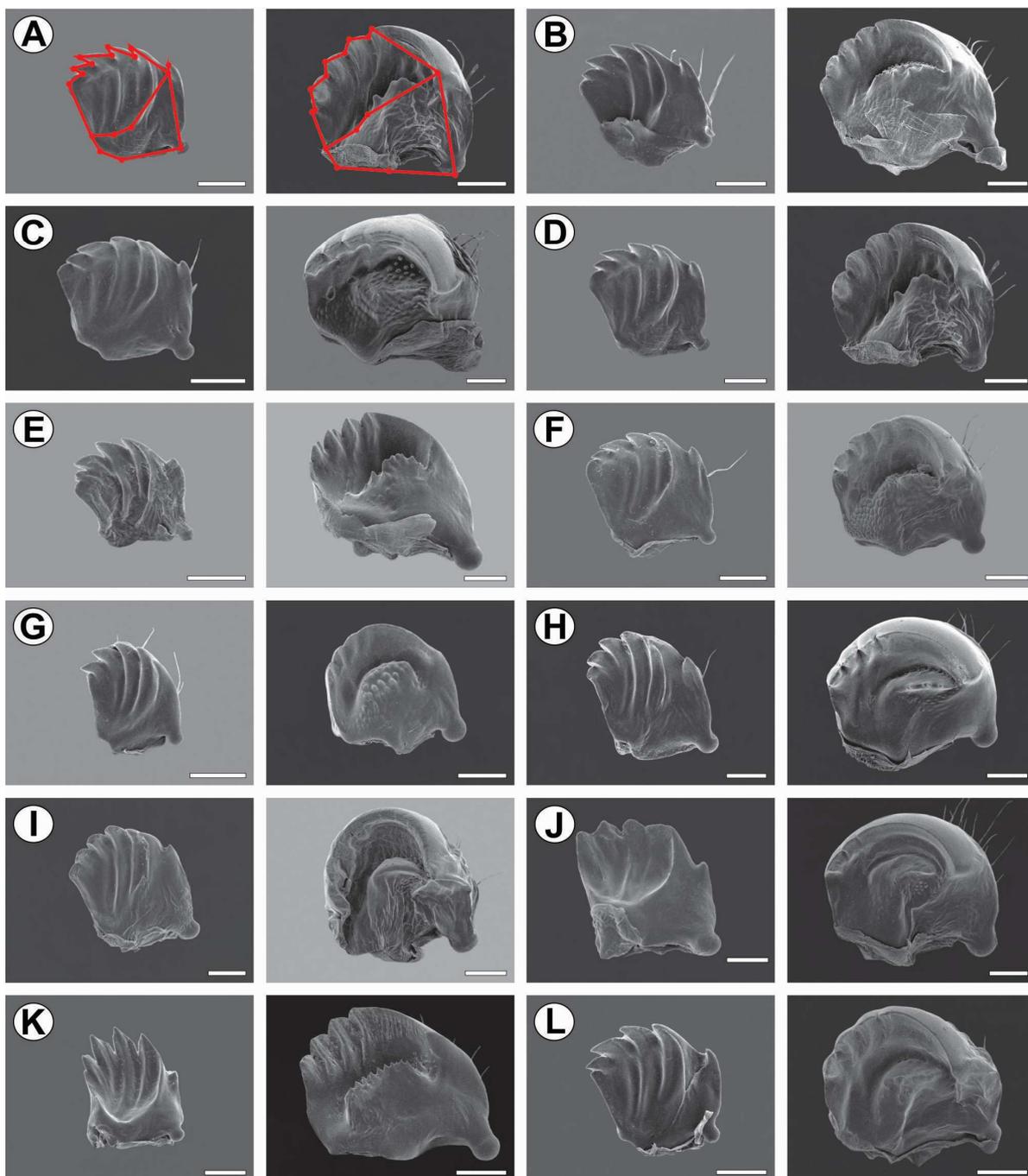
Região	Marco Anatômico	Descrição
Condilar	1	Côndilo posterior da mandíbula
	2	Posição central da margem distal, entre os dois côndilos mandibulares
	3	Côndilo anterior da mandíbula
Molar	4	Limite lateral esquerdo da margem da região molar
	5	Limite proximal do dente 11-12 com a margem da região molar
	6	Limite proximal do dente 9-10 com a margem da região molar
Incisora	7, 9, 11, 13, 15 e 17	Ápice do dente incisivo
	8, 10, 12, 14 e 16	Base externa entre dentes incisivos

**S3.** Porcentagens de identificação corretas dos cinco instares larvais de 11 espécies de heliconíneos segundo análise discriminante (LDA)

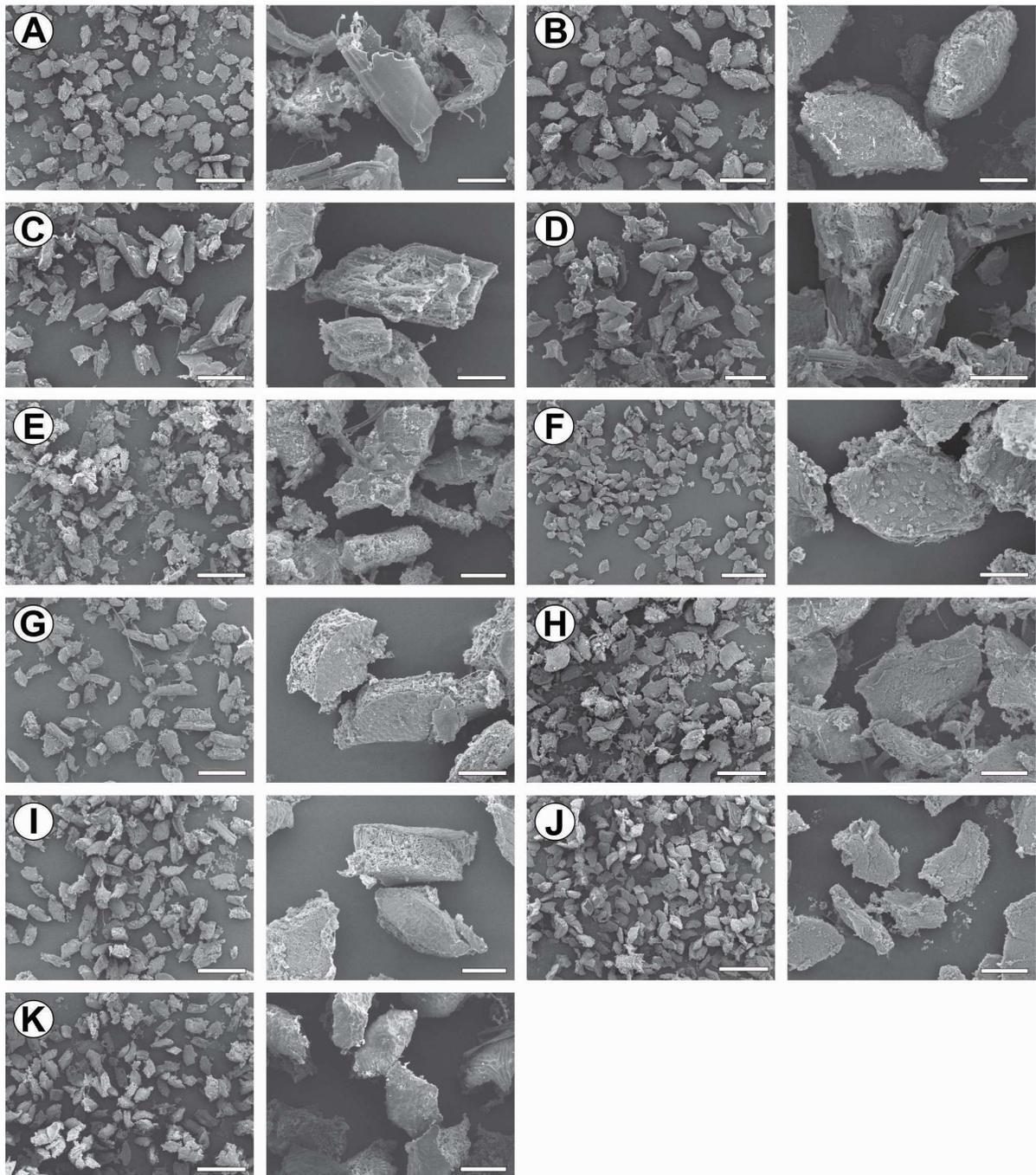
Espécie	Classificação correta/instar larval (%)				
	L1	L2	L3	L4	L5
<i>Agraulis vanillae</i>	100	100	100	100	100
<i>Dione juno</i>	100	100	100	100	100
<i>Dryadula phaetusa</i>	100	100	80	80	80
<i>Dryas iulia</i>	100	100	89	89	82
<i>Eueides aliphera</i>	100	80	75	83	75
<i>Heliconis charithonia</i>	100	100	100	100	100
<i>Heliconius erato</i>	100	90	100	100	100
<i>Heliconius ethilla</i>	100	100	89	89	92
<i>Heliconius sara</i>	86	75	75	87	75
<i>Laparus doris</i>	100	100	86	100	89
<i>Philaethria wernickei</i>	100	100	90	75	86



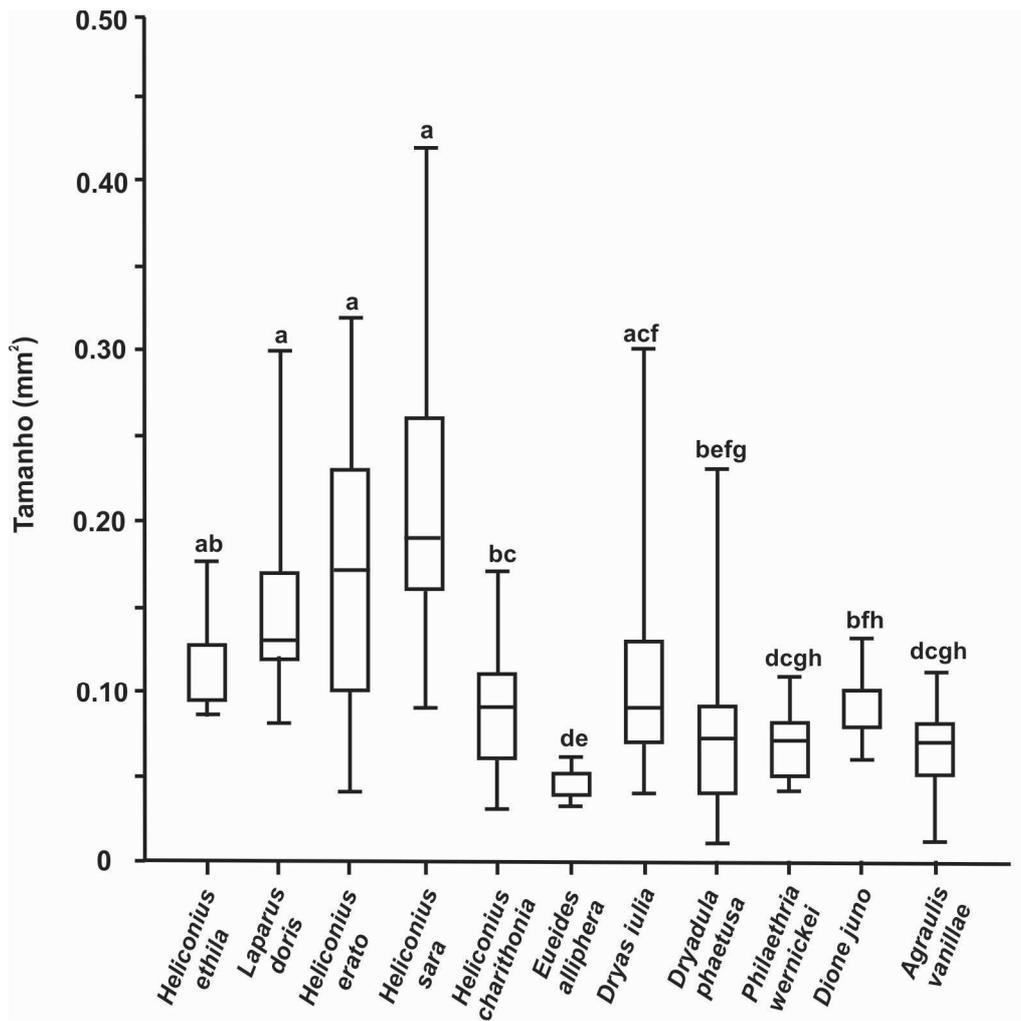
**Fig. 1**  
Millan et al. 90 mm



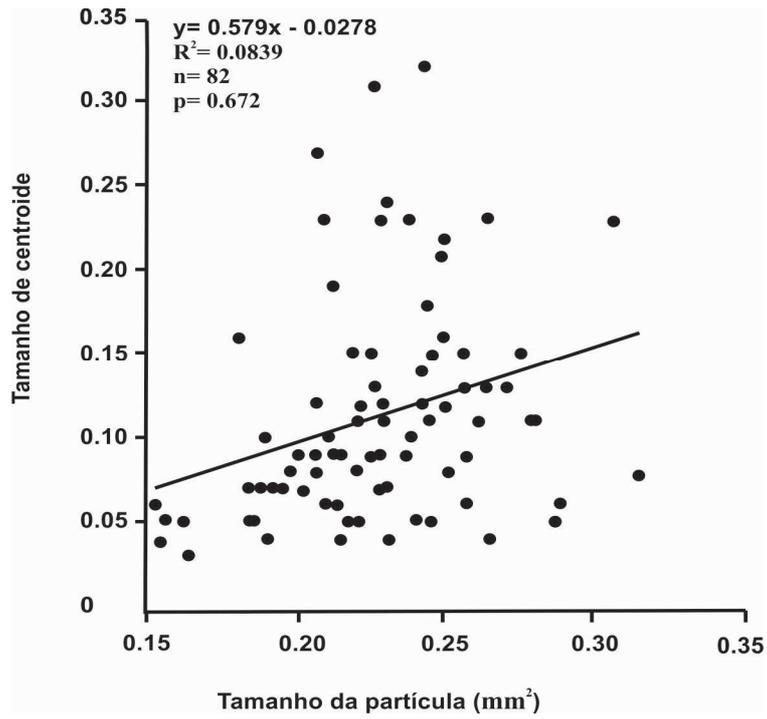
**Fig. 2**  
**Millan et al. 190 mm**



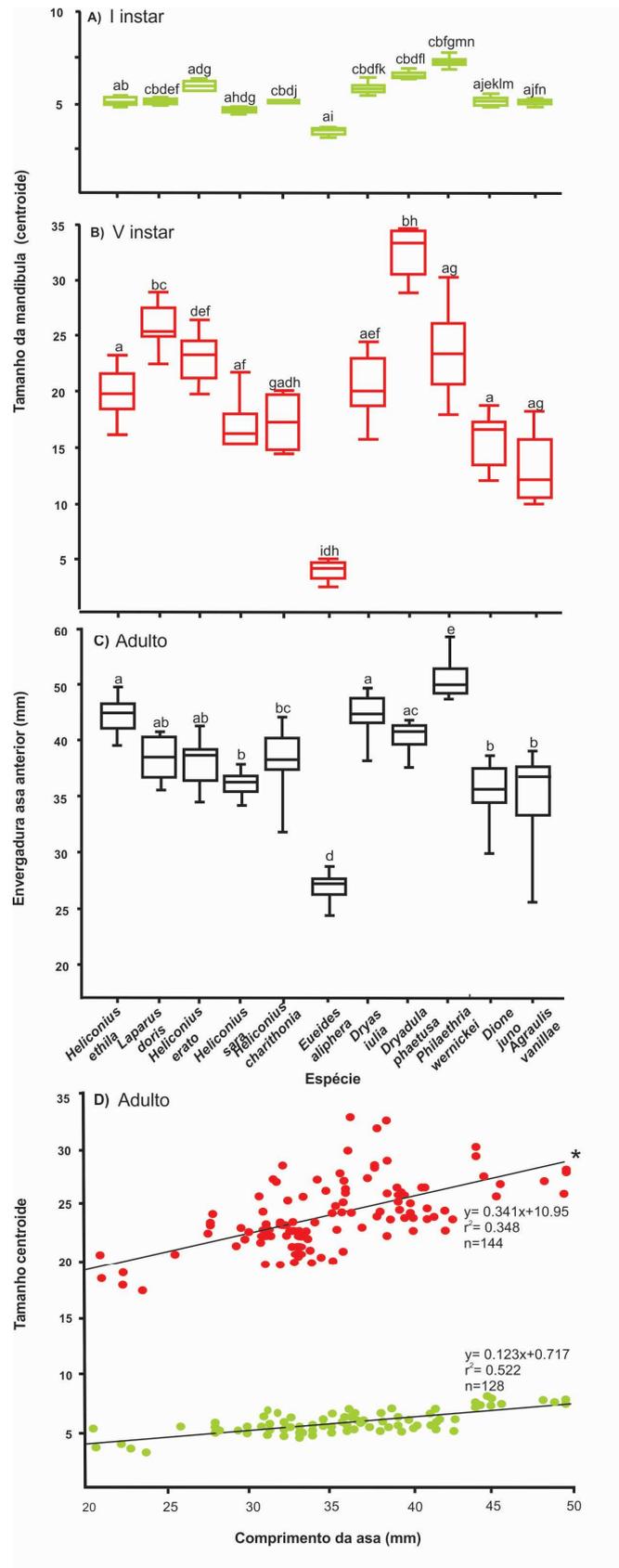
**Fig. 3**  
**Millan et al. 190 mm**



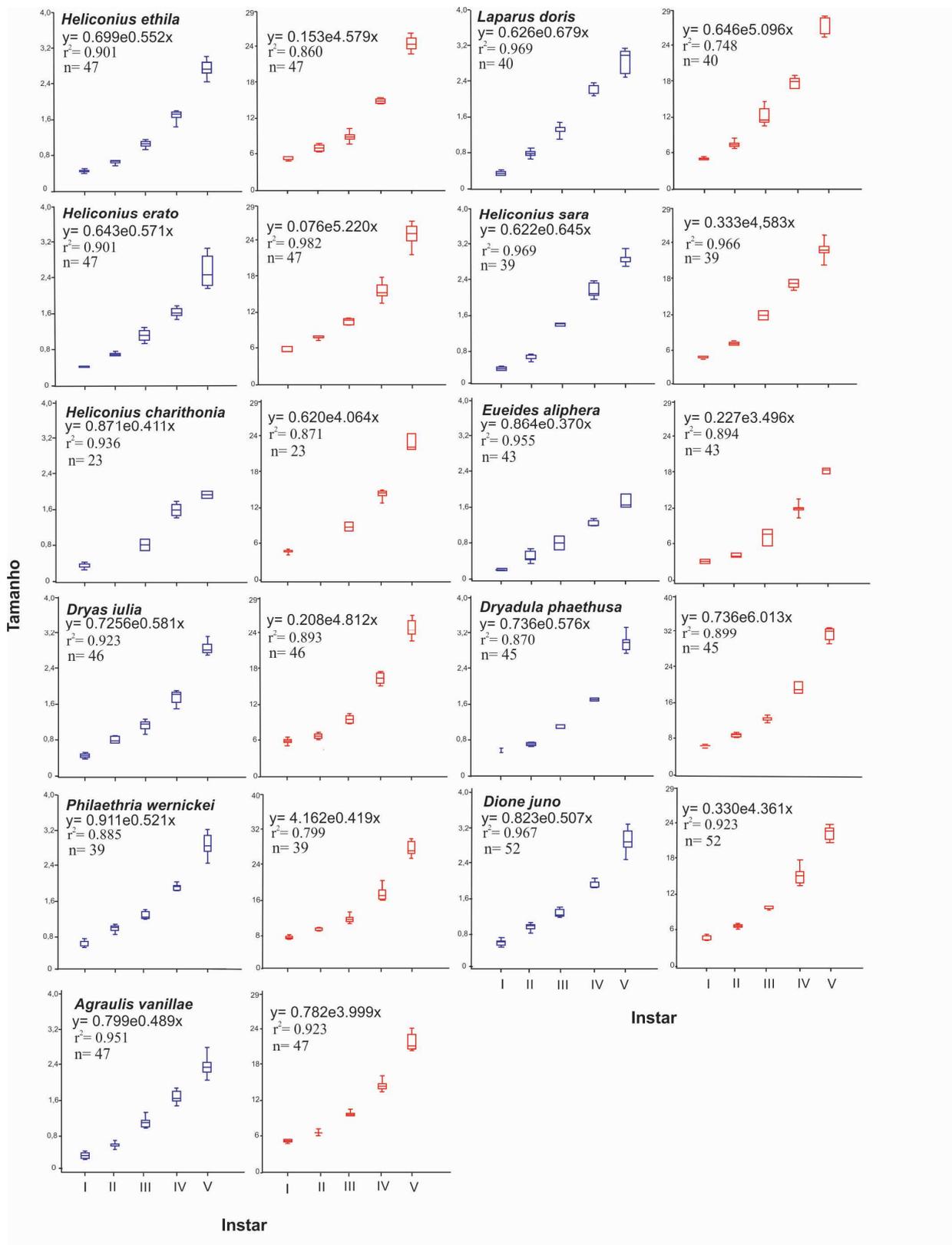
**Fig. 4**  
**Millan et al. 90 mm**



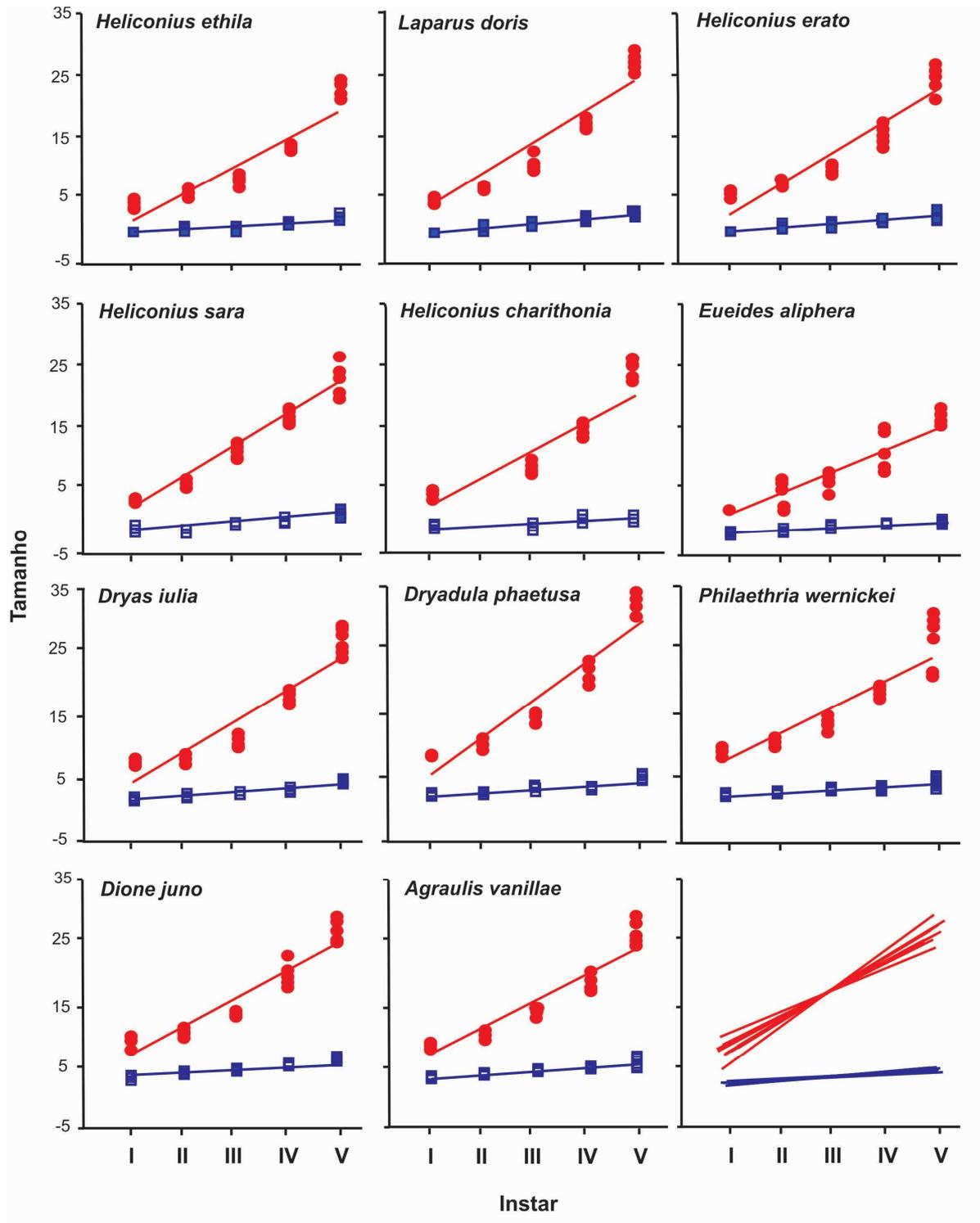
**Fig. 5**  
**Millan et al. 90 mm**



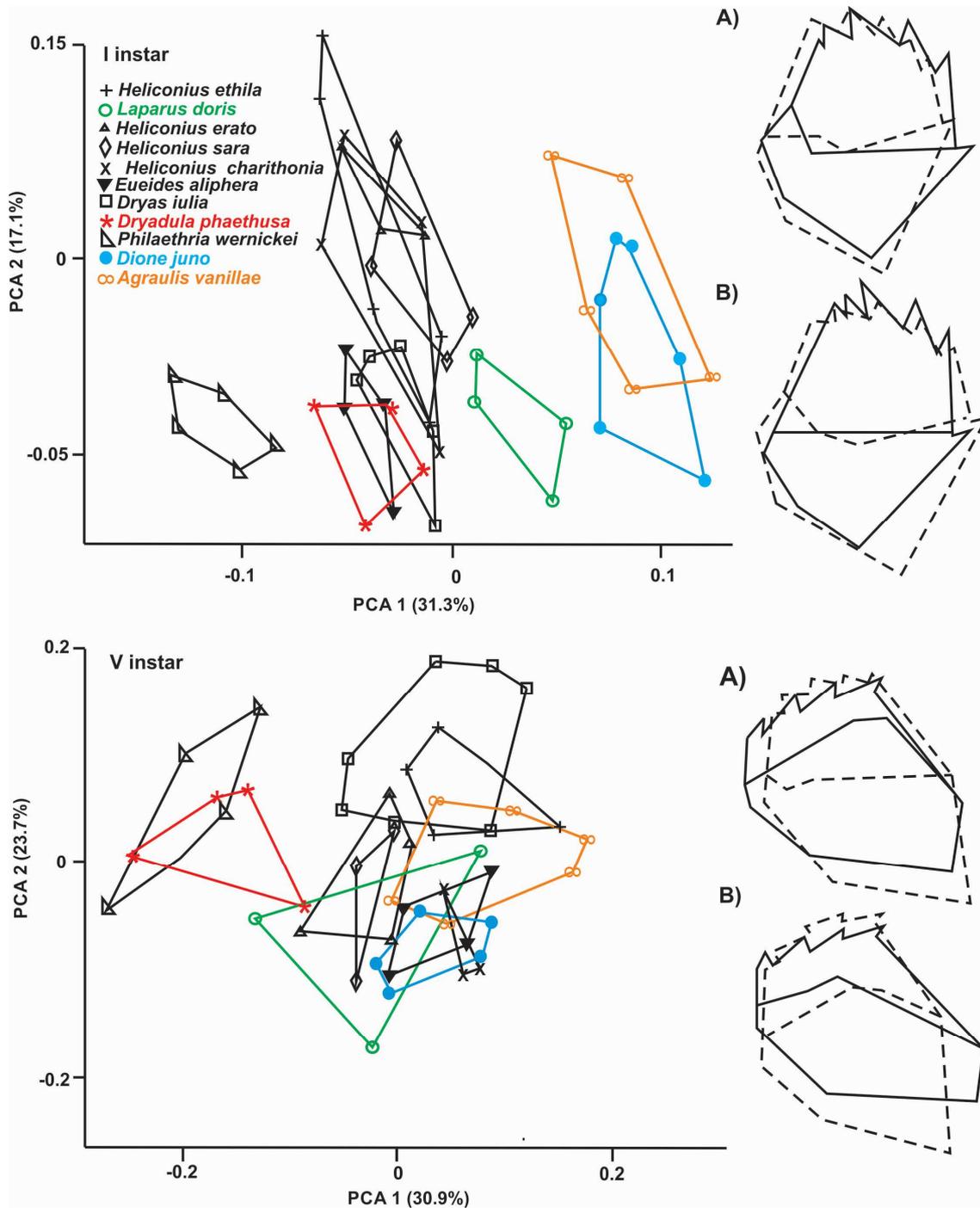
**Fig. 6**  
 Millan et al. 90 mm



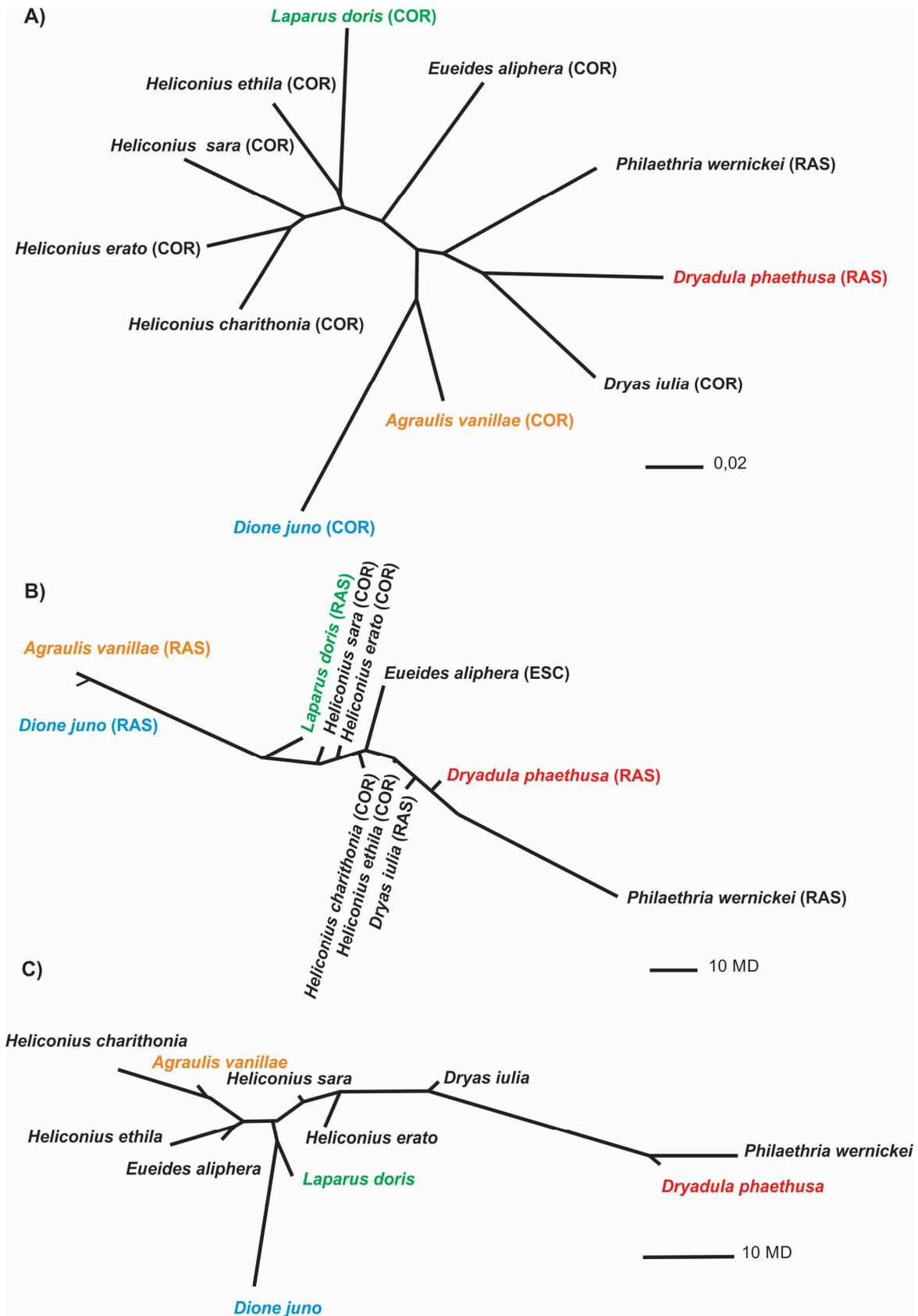
**Fig. 7**  
**Millan et al. 190mm**



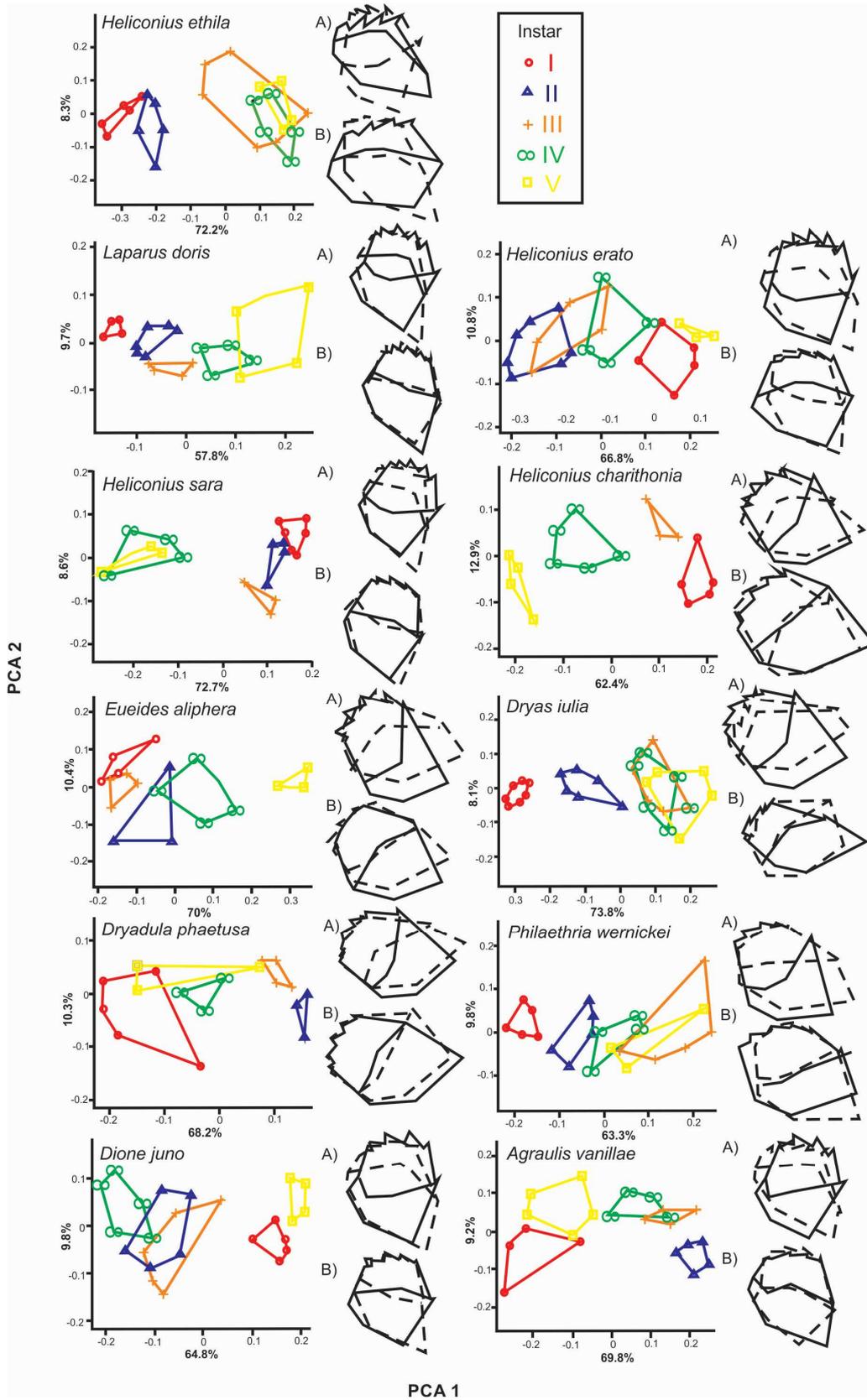
**Fig. 8**  
Millan et al. 190mm



**Fig. 9**  
Millan et al. 140mm



**Fig. 10**  
 Millan et al. 140 mm



Material suplementar S2  
Millan et al. 140 mm

## Lista de tabelas

**Tabela 1.** Descrição morfológica das mandíbulas de primeiro e quinto instares de onze espécies de heliconíneos.

**Tabela 2.** Inclinações alométricas ( $\beta$ ) correspondentes ao tamanho da cabeça e tamanho da mandíbula de onze espécies de heliconíneos.

**Tabela 3.** Distância genética pareada (Tamura-Nei, 1993) entre 11 espécies de heliconíneos com base em 2836 nucleotídeos, utilizando o método de máxima composição de verossimilhança. Sobrescritos indicam os valores correspondentes às espécies nas colunas.

**Tabela 4.** Distâncias fenotípicas de Mahalanobis de primeiro (L1) e quinto instar (L5) entre 11 espécies de heliconíneos. Sobrescritos indicam os valores correspondentes às espécies nas colunas.

**S1.** Descrição das regiões da mandíbula e respectivos pontos anatômicos utilizados nas análises morfométricas .

**S3.** Porcentagens de identificação corretas dos cinco instares larvais de 11 espécies de heliconíneos segundo análise discriminante (LDA) .

## Lista de figuras

**Figura 1.** Mandíbula de primeiro instar de *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae), vista mediana. Números se referem aos marcos anatômicos Tipo I usados nas análises morfométricas .

**Figura 2.** A) Localização de pontos anatômicos tipo I em mandíbulas de primeiro e quinto instar de *Heliconius erato*. B – L) Micrografias em microscopia eletrônica de varredura correspondentes a mandíbulas de primeiro (esquerda) e quinto instar (direita) de B) *Heliconius ethila*, C) *Laparus doris*, D) *Heliconius erato*, E) *Heliconius sara*, F) *Heliconius charithonia*, G) *Eueides aliphera*, H) *Dryas iulia*, I) *Dryadula phaetusa*, J) *Philaethria wernickei*, K) *Dione junio* e L) *Agraulis vanillae*. Barra= 50 e 200 $\mu$ m.

**Figura 3.** Micrografias em microscopia eletrônica de varredura correspondentes a partículas contidas no estômago de lagartas de quinto instar de A) *Heliconius ethila*, B) *Laparus doris*, C) *Heliconius erato*, D) *Heliconius sara*, E) *Heliconius charithonia*, F) *Eueides aliphera*, G) *Dryas iulia*, H) *Dryadula phaetusa*, I) *Philaethria wernickei*, J) *Dione junio* e K) *Agraulis vanillae*. Barra= 50 e 200 $\mu$ m.

**Figura 4.** Tamanho das partículas contidas no estômago e o tamanho da mandíbula de lagartas de quinto instar de onze espécies de heliconíneos. Box plots com letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

**Figura 5.** Relação entre o tamanho das partículas contidas no estômago e o tamanho das mandíbulas de lagartas de quinto instar de onze espécies de Heliconiini.

**Figura 6.** Tamanho da mandíbula de primeiro (A) e quinto (B) instares, (C) dos adultos e (D) relação entre o tamanho dos adultos e o tamanho do centroide mandibular, de ambos os instares (primeiro em verde e quinto em vermelho), em onze espécies de heliconíneos. Box plots com letras diferentes diferem estatisticamente (ANOVA,  $p < 0,001$ ; testes múltiplos de Tukey,  $p < 0,001$ ) e o asterisco indica existência de diferença estatística entre as inclinações das retas (MANOVA,  $p < 0,001$ ).

**Figura 7.** Variação na altura da cápsula cefálica (mm; box plots azuis) e tamanho da mandíbula (centroide; box plots vermelhos) dentre os instares de onze espécies de heliconíneos. Há diferenças estatísticas dentre os instares em todas as espécies (ANOVAs,  $p < 0,001$ ).

**Figura 8.** Variação na altura da cápsula cefálica (mm; quadrados azuis preenchidos) e da mandíbula (centroide; círculos vermelhos) de onze espécies de heliconíneos. As comparações entre as retas correspondentes, usando o total de dados, apresentam diferenças significativas quanto à inclinação em todas as espécies (ANCOVAs,  $p < 0,001$ ). Extremo inferior direito mostra a tendência geral de crescimento das duas estruturas nas onze espécies.

**Figura 9.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares, no primeiro e quinto instar, de onze espécies de heliconíneos. **A)** e **B)** representam as deformações obtidas por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), respectivamente. Há diferenças dentre os instares das espécies (MANOVAs,  $p < 0,001$ ).

**Figura 10.** Árvores Neighbor-Joining (não enraizadas) da A) análise filogenética Bayesiana com base na análise combinada de dados de DNA mitocondrial (COI) e nuclear (EF1alfa e *wingless*), totalizando 2836 nucleotídeos e das distâncias fenotípicas de Mahalabonis para forma mandibular de B) primeiro e C) quinto instar de onze espécies de heliconíneos. Entre parêntesis os hábitos alimentares das espécies (RAS: Raspadora; COR: Cortadora; ESC: Escavadora).

**S2.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares dentre os instares de onze espécies heliconíneos. A, B) representam as deformações por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), respectivamente. Linhas contínuas representam deformações na horizontal e linhas tracejadas deformações na vertical, dentro de cada componente. Há diferenças dentre os instares das espécies (MANOVAs,  $p < 0,001$ ).

## CAPITULO 2.

### **PLASTICIDADE FENOTÍPICA NA MANDÍBULA DE *Heliconius erato* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) PELO USO DE DIFERENTES HOSPEDEIROS (PASSIFLORACEAE).**

Carolina Millan<sup>1</sup>, Rodrigo Fornel<sup>2</sup>, Gilson R.P. Moreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500,91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil,

lepidoptera.azul@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Ciências, Laboratório de Ecomorfologia, Animal, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Rua Sete de Setembro, 1621, 99700-000, Erechim, Brasil,

rodrigofornel@hotmail.com

<sup>3</sup>Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500,91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil,

gilson.moreira@ufrgs.br

Título corrido: Plasticidade fenotípica na mandíbula de *H. erato*

#### **RESUMO**

Plasticidade fenotípica é definida como a capacidade de um organismo em desenvolver fenótipos adaptativos frente a condições ambientais flutuantes.

Características apresentadas pelas plantas, tais como uma alta dureza e espessura das folhas, podem influenciar a acessibilidade dos insetos herbívoros. Nesse contexto, as mandíbulas e musculatura acessória de larvas de lepidópteros desempenham um papel

importante na sobrevivência e desenvolvimento destas, pois são as que determinam se as partículas vegetais de um potencial hospedeiro podem ou não ser ingeridas e aproveitadas.

*Heliconius erato* é uma espécie de heliconíneo cujas larvas se alimentam de espécies de maracujás (Passifloraceae). No que se refere às características mandibulares e suas possíveis adaptações em indivíduos que consomem uma ou outra planta, estudos comparativos (forma e tamanho) são inexistentes. Neste estudo, testamos a hipótese de que larvas de *H. erato* criadas em quatro espécies de plantas hospedeiras apresentariam diferenças quanto ao tamanho e/ou forma das mandíbulas, assim como exibiriam diferenças no tamanho do músculo adutor associado às mandíbulas; esperamos também que as taxas de crescimento entre as duas estruturas apresentem diferenças, dependendo da planta hospedeira onde os indivíduos foram criados. Larvas de *H. erato* foram criadas em *P. actinia*, *P. caerulea*, *P. misera* e *P. suberosa* até atingir o quinto instar larval, sendo posteriormente dissecadas suas cabeças e medidas quanto ao tamanho da cápsula cefálica e da mandíbula e área do músculo adutor das mandíbulas, na procura de possíveis alometrias. Foi usada morfometria geométrica e microscopia eletrônica de varredura para determinar possíveis diferenças de forma no aparelho bucal dos indivíduos. Os resultados mostraram que não existem diferenças de tamanho entre as mandíbulas nem músculos adutores mandibulares dos indivíduos criados nas 4 plantas hospedeiras. Aparentemente, a mandíbula dos indivíduos cresce proporcionalmente mais que o músculo adutor, cujo crescimento quase nulo (reta paralela ao eixo X) mostrou-se altamente conservado em todos os indivíduos. Por outro lado, foi possível constatar diferenças significativas na forma mandibular dos indivíduos dependendo da planta hospedeira; dita mudança corresponde ao alongamento dos dentes da região incisora nas mandíbulas de lagartas criadas em *P. suberosa*. Sugerimos que dita

mudança seja devido a que esse hospedeiro apresenta uma maior dureza e espessura foliares quando comparado com os outros utilizados e, portanto, o investimento em dentes mais longos “facilitariam” de alguma maneira o acesso por parte das mandíbulas cortadoras já reconhecidas para a espécie.

**Palavras chave:** Morfometria geométrica, alometria, músculo adutor, forma, tamanho, aparelho bucal, herbivoria, interação.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Interação inseto-planta, herbivoria e estrutura mandibular em insetos herbívoros.

As interações de herbivoria entre insetos e seus hospedeiros vegetais conformam um sistema complexo e altamente dinâmico, pois ao longo do processo evolutivo tanto insetos como plantas desenvolveram associações que vão desde mais generalistas até mais especialistas (Bernays 1998). Enquanto plantas apresentam barreiras que podem impedir ou dificultar acesso dos herbívoros, tais como substâncias do metabolismo primário e secundário, barreiras físicas e fenologia variável (Larsson 2002), os insetos por outro lado respondem com diversos mecanismos fisiológicos e comportamentais que afetam sua performance e influenciam a evolução das suas estruturas (Menna-Barreto e Araujo 1985, Périco e Araujo 1991, Price 1997, Bernays 1998, Larsson 2002).

Durante a alimentação as mandíbulas de insetos mastigadores são encarregadas de cortar o alimento em fragmentos que possam ser ingeridos (Chapman 1998). As mandíbulas em si apresentam duas áreas distintas em sua morfologia externa: Uma parte distal, denominada região incisora, que contém os dentes incisores e é responsável por cortar o alimento, e uma área proximal que tritura o alimento e é

denominada região molar (Chapman 1995). Internamente, a anatomia do aparelho mandibular tem sido estudada em ortópteros (Baines et al. 1990), himenópteros (Masuko 1986; Rehder 1989, Paul e Gronenberg 2002) e larvas de esfingídeos (Griss 1990).

Para borboletas, no entanto, pouco se conhece sobre as estratégias de alimentação adotadas pelas larvas e sua evolução, especialmente em relação à morfologia do aparelho bucal e as características associadas ao tipo de alimento (Duarte et al. 2003). DeVries et al. (1985) examinaram a variação na morfologia mandibular de alguns ninfálídeos. Com relação à estrutura de corte da borda, reconheceram dois padrões que denominaram como “Mandíbulas dentadas” e “Mandíbulas lisas”. As mandíbulas lisas foram codificadas como um carácter apomórfico presente nas subfamílias Satyrinae, Morphinae, Charaxinae e Apaturinae. Adicionalmente, Ackery et al. (1999) sugeriram que a redução e perda dos dentes poderiam ser utilizadas para separar grupos taxonômicos.

Em larvas de lepidópteros, que possuem mandíbulas dicondílicas e aparelhos bucais hipognatos, existe um par de músculos inseridos em apodemas que estão localizados em cada um dos lados do plano de articulação e se encarregam dos movimentos de abdução e adução (Snodgrass 1935, 1950). Ditos músculos se originam na porção antero-dorsal da cabeça, onde o músculo abductor é encarregado da rapidez de contração e o músculo adutor confere a força para o fechamento das mandíbulas, sendo responsável de gerar grande parte da força empregada para cortar o alimento. Devido a isso que o músculo adutor é maior que o abductor e ocupa praticamente toda a cavidade cefálica (Das 1937, Snodgrass 1935, Chapman 1995, Vegliante 2005).

O tamanho e a forma da cápsula cefálica em insetos estão intimamente ligados ao tamanho do músculo adutor, que a sua vez está diretamente relacionado ao tipo de

dieta adotado pelos herbívoros. Bernays (1986) demonstrou que o tamanho da cabeça é maior em espécies de gafanhotos e lagartas de *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) especializados em gramíneas rígidas quando comparadas com espécies não especializadas. Ainda, a autora induziu alometria no tamanho da cabeça em relação ao tamanho do corpo de lagartas de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae) submetidas a diferentes dietas; onde a alimentação com tecidos rígidos provocou um aumento do músculo adutor mandibular e, portanto, cabeças significativamente maiores do que aqueles indivíduos alimentados com dieta artificial (extremamente macia).

A forma das estruturas corpóreas também é influenciada pelo tipo de dieta. É reconhecido que larvas de Saturniidae (Lepidoptera) geralmente possuem mandíbulas pequenas e simples adequadas para consumir de folhas rígidas; enquanto larvas de Sphingidae (Lepidoptera) possuem mandíbulas longas e dentadas utilizadas para rasgar as folhas jovens e tenras das quais se alimentam. Bernays e Janzen (1988) descobriram que o esfingídeo *Enyo ocypete*, a diferença das outras espécies do grupo, se alimenta hospedeiros de folhas mais duras e, conseqüentemente, apresenta mandíbulas tipo “Saturniidae”, sugerindo que a forma mandibular corresponde ao tipo de alimento consumido pelos indivíduos. Brannen et al. (2005), também evidenciaram mudanças de forma em larvas da espécie *Agabusdes integratus* (Coleoptera: Dytiscidae), uma espécie predadora de hábitos aquáticos, como resultado de variações nas estratégias de capturadas presas e diferentes características das mesmas.

Por outro lado, Alexander (1961) realizou observações da forma mandibular de seis espécies de Heliconiini e a associou à maneira como os indivíduos se alimentavam dos hospedeiros. Nessas descrições, a autora relata detalhes sobre a forma como esses

insetos se alimentariam das nervuras das folhas (quebrando-as para amolece-las) e tecidos rígidos (raspando a superfície foliar) segundo a forma e capacidade das suas mandíbulas. Embora suas descrições do comportamento de consumo por parte das espécies foram detalhadas, descrições das formas mandibulares estiveram restritas a ilustrações rudimentares e as comparações objetivas foram ausentes, isso devido à inexistência de ferramentas estatísticas na época, o que só foi possível depois o surgimento da morfometria geométrica, posteriormente aplicada nesses indivíduos por Millan et al. (2016).

Aymone (2009) evidenciou constrição da região posterior da cápsula cefálica em relação ao primeiro instar de oito espécies de heliconíneos, relativamente à crescente expansão no transcurso da ontogênese, o que a autora relacionou principalmente ao crescimento da mandíbula e à musculatura adutora associada, alojada na região pósterodorsal da cabeça dessas borboletas. A pesar das espécies sofrerem variações na forma da cápsula cefálica, as análises fenotípicas de forma cefálica feitas pela autora não corroboraram filogenia molecular reconhecida para o grupo (Beltrán et al. 2007). Nesse sentido, Millan et al. (2016) em estudos realizados com 11 espécies do grupo demonstraram que diferenças nesse parâmetro obedecem a convergências ao longo da ontogênese, e que poderiam estar diretamente associadas aos diferentes hábitos alimentares adotados pelas espécies ao longo da sua trajetória evolutiva.

## **1.2. *Heliconius erato phyllis* e suas hospedeiras pasifloraceas.**

*Heliconius erato phyllis* (Fabricus 1775) é uma espécie de lepidóptero oligófago da tribo Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) de ampla distribuição em todo o

Brasil, exceto na região amazônica (Holzinger e Holzinger 1994). Os indivíduos refletem relações de herbivoria estreitas com seus hospedeiros; possuem uma alta capacidade de orientação espacial com relação à localização dos mesmos e uma acentuada capacidade de inspecionar a sua qualidade (Mugrabi-Oliveira e Moreira 1996 a, b).

No que se refere à aceitabilidade de hospedeiros, *Heliconius erato* também é caracterizada por ser altamente especialista (Périco e Araujo 1991, Périco 1995) assim como quanto à escolha de local de oviposição por parte das fêmeas adultas, que colocam seus ovos preferivelmente em folhas jovens (tenras) e gavinhas (Mugrabi-Oliveira e Moreira 1996 a, b), caracterizadas geralmente por apresentar menor dureza e espessura que as folhas maduras (Fenny 1970, Raupp 1985, Barp et al. 2006, Elpino-Campos 2010).

Rodrigues e Moreira (1999) observaram que larvas de instares iniciais tendem a se alimentar de tecidos vegetais jovens do hospedeiro, avançando para a base do ramo a medida que transcorre a ontogênese. Os autores também corroboraram uma mortalidade significativa quando lagartas jovens foram condicionadas à alimentação com folhas maduras, o que foi atribuído posteriormente por Silveira (2002) e Elpino-Campos (2010) à incapacidade dos indivíduos para consumir tecidos vegetais rígidos característicos dessas folhas.

No estudo de Silveira (2002), observações realizadas em lagartas jovens de *H. erato* evidenciaram um maior desgaste e quebra de dentes incisores das mandíbulas de larvas que se desenvolveram em folhas maduras de *P. suberosa*, presumivelmente por possuir uma maior dureza e espessura que outras espécies de *Passiflora* utilizadas como recurso pela espécie. *P. suberosa* representaria um tipo de tecido vegetal inapropriado para as mandíbulas cortadoras e moles (Elpino-Campos 2012) de lagartas jovens,

impossibilitando-as de se alimentar e ocasionando-lhes a morte por inanição.

Adicionalmente, Silveira (2002) salientou a presença de dentes finos e longos na região incisora da mandíbula de larvas de primeiro instar, assim como regiões molares pouco conspícuas, duas condições propícias para cortar tecidos vegetais ternos e finos.

No Rio Grande do Sul existe registro de 9 espécies de *Passiflora* utilizadas como hospedeiras por *H. erato*: *Passiflora actínia* Hook, *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora caerulea* Linnaeus, *Passiflora cápsularis* Linnaeus, *Passiflora edulis* Sims, *Passiflora elegans* Mast, *Passiflora misera* Kunt, *Passiflora suberosa* Linnaeus e *Passiflora tenuifila* Killip (Sacco 1962, 1980), dentro das quais, *P. edulis* foi considerada hospedeira inapropriada para a espécie por ocasionar uma alta mortalidade larval (87%) e *P. alata* e *P. tenuifila* foram consideradas hospedeiras letais para a espécie com uma mortalidade larval do 100%, atribuída a defesas químicas (Périco e Araujo 1991). *Passiflora suberosa* e *P. misera* foram os hospedeiros mais utilizados (Menna-Barreto e Araujo 1985, Périco 1995), sendo o último o preferido pelas fêmeas no momento da oviposição (Kerpel e Moreira 2005)

A pesar de *P. misera* apresentar uma menor quantidade de nutrientes que outras hospedeiras, é a planta que confere uma melhor performance larval para *H. erato* (Menna-Barreto e Araujo 1985, Perico 1995, Kerpel 2004). O fato anterior indicaria que o desempenho associado a herbivoria e consumo de hospedeiros se relaciona não somente ao conteúdo nutricional dos mesmos, mas também aos mecanismos morfológicos e comportamentais envolvidos pelos insetos durante o processo de alimentação, que os ajudam a consumir o recurso (Elpino-Campos 2012). Elpino-Campos (2012) em estudo comportamental sobre o tempo relativo aos comportamentos de repouso, alimentação, deslocamento, prova e corte de nervura foliar por parte de larvas de *H. erato* em folhas jovens e maduras de cinco espécies de *Passiflora*,

corroborou a existência de variação expressiva do tempo investido em relação à idade da folha quanto à dureza e espessura das mesmas. Nesse estudo, embora houve influência ontogenética no incremento da dureza mandibular, não foram detectados indícios de que as características da planta influenciasses no aumento de dito parâmetro.

Dentro desse contexto e levando em conta os estudos prévios, ainda permanecem inexploradas questões relacionadas com a descrição e quantificação dos processos evolutivos que envolvem mudanças nas taxas de crescimento e/ou possíveis mudanças de forma que sofrem as estruturas alimentares dos heliconíneos frente ao consumo de passifloráceas, tanto aquelas que conferem maior performance como aquelas que apresentam defesas morfológicas ou químicas. Assim, o presente artigo tem a hipótese de que o uso de diferentes espécies de hospedeiras por parte da espécie *H. erato* influenciariam o tamanho, as taxas de crescimento e a forma das mandíbulas deste, podendo-se atribuir essas modificações à planta hospedeira utilizada por plasticidade fenotípica quanto a este caráter.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Criação de larvas**

As larvas de *Heliconius erato* foram obtidas de ovos de fêmeas mantidas em insetário, previamente coletadas em diferentes locais de Porto Alegre RS, e criadas em condições ambientais controladas de laboratório, no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, e criadas *ad libitum* sobre ramos de *Passiflora actinia* (n=12), *Passiflora caerulea* (n=14), *Passiflora misera* (n=16) e *Passiflora suberosa* (n=14); plantas que foram provenientes

de uma criação de passifloráceas existente no local e hospedeiras da espécie no Rio Grande do Sul conforme registrado na literatura (Menna-Barreto e Araujo 1985, Périco 1995, Rodrigues e Moreira 2002).

Vouchers correspondentes encontram-se depositados na coleção do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos (LMCI) da UFRGS, sob o código de acesso LMCI 250.

## **2.2. Fixação, dissecação e análise da mandíbula**

Um dia após ter atingido o quinto instar larval, todas as lagartas de *Heliconius erato* criadas nas quatro plantas hospedeiras foram fixadas em fluído de Dietrich e preservadas em álcool 70%. As cápsulas cefálicas foram dissecadas e subdivididas por corte sagital central. Usando a metade esquerda, foi medida a distância da inserção do côndilo anterior à base do escolo dorsal. Para observação das mandíbulas, as cabeças dos indivíduos foram dispostas em posição horizontal sobre lâmina de microscopia coberta com fita branca de dupla face para garantir fixação, utilizando-se os côndilos mandibulares como referência. Posterior à montagem, as mandíbulas foram fotografadas em vista frontal com câmera digital Nikon® DS-U3 montada em um microscópio Nikon® AZ100M, usando o software de imagem NIS-Elements para posteriores análises alométricas e morfométricas.

## **2.3. Fixação do músculo adutor mandibular**

Seguindo o procedimento de fixação e montagem da cápsula cefálica e mandíbulas descritos anteriormente, o músculo adutor mandibular da metade direita dos indivíduos criados nas quatro plantas hospedeiras foi localizado e calculada sua área mediante medidas de R (diâmetro do músculo adutor), Hf (altura frontal do músculo

adutor) e Hd (altura dorsal do músculo adutor), segundo Aymone (2006), com vistas a posteriores comparações alométricas.

#### **2.4. Análises alométricas e morfométricas.**

Ao não serem cumpridos os pressupostos de normalidade (Testes Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Testes de Hartley), as comparações de comprimento das cabeças, tamanho das mandíbulas e músculos adutores mandibulares foram analisados com estatística não paramétrica. A presença de alometria nas mandíbulas e músculos adutores das larvas de quinto instar foi testada por meio da correlação de Pearson e ANCOVA (GraphPadPrism 5.00) entre as retas de crescimento correspondentes.

A digitação de marcos anatômicos mandibulares e sua localização em coordenadas cartesianas foi feita sobre fotos utilizando o programa TPSdig 2.16 (Rohlf 2010), sendo considerados 17 marcos anatômicos Tipo I e consideradas regiões anatômicas de interesse conforme descrito por Millan et al. 2016 (em construção).

As análises foram feitas utilizando PCA e MANOVA obtidas no programa “R” por meio dos pacotes MASS, Ape, ade4 e stats (Development Core Team 2008) e a forma mandibular analisada com o método de sobreposição de Procrustes (Rohlf e Slice 1990). Para resumir as variáveis, foram utilizadas análises de componentes principais (PCA) com os resíduos de Procrustes. Com esses resíduos testamos a significância da variação ontogenética e filogenética da forma, usando análises multivariadas de variância (MANOVA).

Foram feitas análises de deformações relativas (Rohlf 2006) graficamente através da função “Thin Plate Splines” (Adams e Rosenberg 1998). As relações de proximidade fenotípica foram estabelecidas através de distâncias de Mahalanobis (1936) e árvores Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987) não enraizadas.

### 3. RESULTADOS

Larvas de quinto instar de *H. erato* alimentadas com *Passiflora actinia* exibiram cápsulas cefálicas maiores do que larvas alimentadas com folhas das outras 3 espécies de *Passiflora*. Por outro lado, o tamanho das mandíbulas e áreas do músculo adutor mandibular dos indivíduos não exibiram diferenças estatísticas significativas (Tabela 1) (Fig. 1).

Retas correspondentes ao tamanho da mandíbula e do músculo adutor mandibular de lagartas de quinto instar de *H. erato* criadas nas quatro espécies de *Passiflora* exibiram coeficientes alométricos negativos (Fig. 2). Adicionalmente, nas quatro plantas hospedeiras, houve diferenças significativas entre as inclinações das retas correspondentes à área do músculo adutor e o tamanho da mandíbula dos indivíduos (Tabela 2).

No referente à forma das mandíbulas, a análise de Componentes Principais (PCA) mostrou diferenças significativas entre os indivíduos de *H. erato* criados nas quatro espécies de *Passiflora* (MANOVAs,  $F=2.0125$ ,  $p=0.005780$ ) (Fig. 3), com porcentagens de identificação de 14.26% para indivíduos criados em *P. actinia*, 57.14% para indivíduos criados em *P. caerulea*, 68.75% para indivíduos criados em *P. misera* e 78.57% para indivíduos criados em *P. suberosa*. Posteriormente, e de acordo com ditos resultados, a análise discriminante (LDA) sugere que a mandíbula de indivíduos alimentados com folhas de *P. misera* e *P. suberosa* divergem drasticamente dentro do grupo (Fig. 4).

A árvore de distâncias fenotípicas de Mahalanobis mostrou que a criação com folhas de *P. misera* e *P. actinia* originam larvas com mandíbulas mais similares entre si do que as mandíbulas de indivíduos criados com folhas de *P. suberosa*, os quais se

diferenciam drasticamente do resto do grupo. Adicionalmente, mandíbulas de lagartas alimentadas com *P. caerulea* aparecem como um grupo de “forma mandibular intermediária” entre os grupos formados por *P. misera* + *P. actínia* e o grupo formado pelos indivíduos alimentados com *P. suberosa* (Fig. 5).

#### 4. DISCUSSÃO

Embora seja reconhecido que as passifloráceas variam na sua dureza, espessura foliar e nervuras associadas (Silveira 2002, Elpino-Campos 2010) e que diferenças em ditos parâmetros podem influenciar o tamanho e proporções do músculo adutor mandibular de insetos herbívoros (Bernays 1986), nossos resultados mostram que lagartas de quinto instar de *H. erato* alimentadas desde o início do desenvolvimento em quatro espécies de *Passiflora* não sofrem mudanças drásticas de tamanho mandibular e músculos adutores associados às mandíbulas.

Diversos autores sugerem que as adaptações existentes na mandíbula de insetos herbívoros estão sujeitas aos hábitos alimentares e à natureza do recurso utilizado pelos mesmos (Das 1937, Snodgrass 1935, Bernays 1991) pois durante o processo de alimentação as mandíbulas são a única estrutura encarregada de cortar o alimento em fragmentos que possam ser ingeridos (Chapman 1998). Características de dureza e quantidade de fibras contidas nas folhas das plantas acarretam diferentes níveis de “esforço” por parte do herbívoro (Elpino-Campos 2010) e portanto, folhas mais duras, que acarretam um maior esforço, resultariam em maiores investimentos em musculatura mandibular adutora que tornaria o aparelho mandibular mais adequado para o consumo; ao contrário de folhas tenras, onde os indivíduos, em teoria, não teriam um investimento diferenciado em incremento da musculatura mandibular (Bernays 1986). Como dito anteriormente e obedecendo às diferenças fenológicas conhecidas entre as pasifloráceas

utilizadas, tal fenômeno não foi evidenciado nesse estudo, possivelmente devido ao investimento em mudanças plásticas de forma mandibular evidenciadas pelos indivíduos e discutidas a continuação.

Mudanças de forma mandibular foram evidenciadas em lagartas de quinto instar de *H. erato* dependendo da espécie de *Passiflora* utilizada como alimento, o que sugere um efeito direto da planta hospedeira sobre dito parâmetro, não associado ao tamanho, como demonstrado anteriormente, nem a processos de desgaste sofrido pelas mandíbulas já que, sendo *P. suberosa* o hospedeiro com folhas mais duras quando comparada com *P. misera* e *P. caerulea* (Elpino-Campos 2010), seria esperado que os indivíduos que se alimentaram das suas folhas apresentassem dentes incisores mais lisos, devido ao desgaste excessivo, do que indivíduos criados nos últimos dois hospedeiros, que apresentam menor grau de dureza foliar e menores espessuras do limbo e da nervura central (Elpino-Campos 2010); fato que não aconteceu. Embora mandíbulas desprovidas de dentes ou com dentes aplanados são associadas a insetos que se alimentam de folhas mais tenras (Bernays e Janzen 1988), nossos resultados revelaram que indivíduos alimentados com *P. suberosa* exibem dentes incisores mais longos e conspícuos do que os criados em *P. caerulea* e *P. misera*, que foram menores e mais parecidos entre si.

Levando em conta que os indivíduos de *H. erato* possuem mandíbulas cortadoras do início ao fim da sua ontogênese (Millan et al. 2016), com aumento progressivo da dureza a medida que avança o desenvolvimento (Elpino-Campos 2010); que mudanças na dureza mandibular entre larvas da espécie alimentadas com diversas plantas hospedeiras foi descartada (Elpino-Campos 2010) e que a plasticidade fenotípica é entendida como uma capacidade meramente adaptativa dos indivíduos às condições que lhes são impostas, sempre a partir de um fenótipo e/ou comportamento

preexistentes (Whitman e Ananthakrishnan 2009), sugerimos que dita característica de dentes mais pronunciados (e naturalmente fortalecidos pela trajetória ontogenética) em lagartas de último instar alimentadas com *P. suberosa* seja devido a uma adaptação plástica da mandíbula “cortadora”, preexistente nesses indivíduos, para maximizar o efeito de “corte” das folhas duras do hospedeiro, que embora possuindo tal característica, é reconhecido como um recurso altamente utilizado pelas fêmeas em condições naturais (Menna-Barreto e Araujo 1985, Périco e Araujo 1991) e que origina mais adultos viáveis, em decorrência outros hospedeiros, por exemplo, *P. misera* (Menna-Barreto e Araujo 1985).

Danos ocorridos nas mandíbulas e a alta mortalidade exibidos por larvas jovens de *H. erato* evidenciados por Rodrigues e Moreira (1999) e Silveira (2002) podem ser atribuídos não somente à impossibilidade das mandíbulas dentadas desses indivíduos para consumir tecidos rígidos, como exposto por esses autores, mas também à sua menor dureza; pois indivíduos de quinto instar com mandíbulas fortemente dentadas, como demonstrado nesse estudo, conseguem consumir eficientemente folhas duras de *P. suberosa*. Em outros hospedeiros onde as folhas são mais tenras, como *P. misera* e *P. caerulea*, larvas de quinto instar *H. erato* apresentaram dentes menos conspícuos, pois por serem hospedeiros com folhas mais tenras (Elpino-Campos 2010) o acesso estaria facilitado e adaptações plásticas na mandíbula não seriam requeridas.

*Passiflora suberosa*, *P. misera* e *P. caerulea* já foram utilizadas em diversos estudos de performance larval de *H. erato phyllis* (Rodrigues e Moreira 1999, Elpino-Campos 2010, Kerpel 2004, Mugarib-Oliveira e Moreira 1996b, Périco e Araujo 1991, Périco 1995, Menna-Barreto e Araujo 1985) mostrando que *P. misera* é o hospedeiro preferido pelas fêmeas (Kerpel e Moreira 2005) e onde as larvas da espécie atingiram

mais rapidamente o estado adulto (Menna-Barreto e Araujo 1985, Périco 1995, Rodrigues e Moreira 2002, 2004), a pesar de apresentar menor quantidade de nutrientes que outras hospedeiras (e.g. *P. suberosa*) (Kerpel 2004) e também das larvas investir muito mais tempo no processo de alimentação (Elpino-Campos 2012).

Uma menor dureza e espessura foliares facilitariam o consumo de um ou outro hospedeiro por parte das larvas (Kerpel 2004); pois em termos energéticos é menos custoso se alimentar por mais tempo em tecidos tenros, compensando o menor conteúdo de nutrientes contidos neles, do que investir no desenvolvimento de adaptações mandibulares para ingerir folhas mais rígidas e nutritivas, sobretudo quando se pensa que o desenvolvimento larval é uma transição curta e necessária para alcançar a etapa adulta, o que não justificaria o investimento de uma condição plástica. Por outro lado, uma alimentação em folhas mais duras imposta pela natureza, como acontece em *P. suberosa* (seja a escolha da fêmea determinada por disponibilidade ou qualidade aparente de hospedeiros), mostrou-se capaz de induzir uma característica plástica, como foi o alongamento dos dentes incisores da mandíbula.

Sugestões sobre o comportamento do aparelho mandibular de lagartas de *H. erato* com relação ao consumo de *P. actínia* não foram possíveis nesse estudo devido à inexistência de dados experimentais prévios sobre dureza e espessura foliares desse hospedeiro, assim como da performance das espécies no mesmo. No entanto, nossos resultados demonstram que indivíduos alimentados com folhas desse hospedeiro possuem uma forma mandibular similar aos alimentados com *P. misera*, sugerindo que *P. actínia* seria uma hospedeira com características similares pelo menos no que se refere a dureza e espessura das folhas, o que resta a ser corroborado.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A forma mandibular de lagartas de quinto instar de *H. erato* exibiram formas diferenciadas dependendo da planta consumida; ditas mudanças estiveram associadas aos dentes incisores, que foram mais pronunciados em indivíduos criados em *P. suberosa*, o hospedeiro com folhas mais duras e espessas. Nesse sentido, características da espécie utilizada como alimento, tais como espessura do limbo foliar e dureza da folha estariam moldando a forma das mandíbulas como resposta a uma adaptação plástica dos indivíduos para acessar ao recurso de forma mais eficiente.

Adicionalmente, coeficientes alométricos negativos foram associados às taxas de crescimento mandibular e de musculatura adutora desses indivíduos. Ditas taxas foram diferentes entre si, nas quatro plantas hospedeiras; onde a mandíbula, em todos os casos, cresceu proporcionalmente mais do que o músculo adutor, que mostrou ser um caráter mais conservado (estável) em todos os indivíduos, independentemente da planta hospedeira.

## **6. AGRADECIMENTOS**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado concedida para a realização desse estudo. Aos revisores do artigo pelas suas sugestões para o melhoramento do mesmo.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

Ackehy, P. R., De Jong, R. and Vane-Wright, R. I., 1999. The butterflies: Hedyloidea, Hesperioidea and Papilionoidea, 263-300pp. In Kristensen, P. N. (ed.). Arthropoda: Insecta. Lepidoptera, moths and butterflies: evolution, systematics, and biogeography. Handbuch der Zoologie. Handbook of Zoology. Walter de Gruyter, Berlin, 491p.

- Alexander, A.J., 1961. A study of the biology and behavior of the Caterpillars, Pupae and Emerging Butterflies of the Subfamily Heliconiinae in Trinidad, West Indies. Part I. Some Aspects of larval Behavior. *Zoologica* 46, 1-24.
- Aymone, A.C., 2006. Alometria cefálica ontogênese de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 37p.
- Aymone, A.C., 2009. Restrições ontogenéticas na evolução da forma da cápsula cefálica em oito espécies de heliconíneos (Lepidoptera: Nymphalidae). Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 107p.
- Baines, R.A., Tyrer, N.M. and Downer, R.G.H., 1990. Serotonergic innervation of the locust mandibular closer muscle modulates contractions through the elevation of cyclic adenosine monophosphate. *Journal of Comparative Neurology*, Philadelphia 294, 623-632.
- Barp, E.A., Soares, G.L.G., Gosmann, G., Machado, A.M., Vecchi, C. and Moreira, G.R.P., 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.
- Bernays, E.A., 1986. Diet-Induced head allometry among Foliage-Chewing insects and its importance for graminivores. *Science* 231 (4737), 495-497.
- Bernays, E. A. and Janzen, D.H., 1988. Saturniid and sphingid caterpillars: two ways to eat leaves. *Ecology* 69 (4), 1153-1160.
- Bernays, E. A., 1991. Evolution of insect morphology in relation to plants.-

- Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences 333, 257-264.
- Bernays, E.A., 1998. Evolution of feeding behavior in insect herbivores. *BioScience* 48, 35–44.
- Bernays, E.A., 2001. Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review of Entomology* 46, 703–727.
- Brannen, D., Barman, E.H. and Wall, W.P., 2005. An allometric analysis of ontogenetic changes (variation) in the cranial morphology of larvae of *Agabusdis integratus* Crotch (Coleoptera: Dytiscidae), using distortion coordinates. *Coleopta Bull* 59, 351-360.
- Chapman, R.F., 1964. The structure and wear of mandibles in some African grasshoppers. *Proceedings of the Zoological Society of London* 142 (1), 107-121.
- Chapman, R. F., 1995. Mechanics of food handling by chewing insects, p. 3-31. In Chapman, R. F. and Boer, G. (eds). *Regulatory mechanisms in insect feeding*. New York, Chapman & Hall, 398p.
- Chapman, R.F., 1998. *The insects: structure and function*. Harvard University Press, Cambridge. 919p.
- Dass, G.M., 1937. The musculature of the mouth-parts of insect larvae. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 80, 39-80.
- DeVries, P. J., Kitching, L. and Vane-Wright, R.I., 1985. The systematic position of *Antirrhoea* and *Caerois*, with comments on the classification of the Nymphalidae (Lepidoptera). *Systematic Entomology*, 11-32.

- Duarte, M., Mielke, O. H. H. and Casagrande M. M., 2003. Notes on larval mandible morphology of *Hylephila phyleus phyleus* (drury) (Hesperiidae, Hesperinae). Journal of the Lepidopterists' Society 57(3), 239-243.
- Elpino-Campos, A., 2010. Características da planta hospedeira, ontogênese e comportamento alimentar de larvas de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1975) (Lepidoptera: Nymphalidae). Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 122p.
- Elpino-Campos, A., 2012. Feeding behavior of *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) larvae on passion vines. Acta ethologica, 1-12.
- Fenny, P., 1970. Seasonal Changes in Oak Leaf Tannins and Nutrients as a Cause of Spring Feeding by Winter Moth Caterpillars. Ecology 51, 565-581.
- Griss, C., 1990. Mandibular motor neurons of the caterpillar of the hawk moth *Manduca sexta*. Journal of Comparative Neurology, Philadelphia 296, 393-402
- Holzinger, H. and Holzinger, R., 1994. *Heliconius* and related genera. Venette, Sciences Nature, 328p.
- Iseley, F.B., 1944. Correlation between mandibular morphology and food specificity in grasshoppers. Annals of the Entomological Society of America 37, 47-67.
- Kerpel, S.M., 2004. Influencia do conteúdo nutricional de *Passiflora suberosa* e *Passiflora misera* na performance, nutrição, digestão e comportamento de escolha de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 163p.

- Kerpel, S.M. and Moreira, G.R.P., 2005. Absence of learning and local specialization on host plant selection by *Heliconius erato*. *Journal Insect Behaviour*. 18,433-452.
- Larsson, S., 2002. Resistance in trees to insects – an overview of mechanisms and interactions. In: Wagner, M.R., Clancy, K.M., Lieutier, F. and Paine, T.D. (Eds). *Mechanisms and Deployment of Resistance in Trees to Insects*. Kluwer, 1-29pp.
- Masuko, K., 1986. Motor innervations and proprioceptors on the mouthparts in the worker honeybee *Apis mellifera*: I. Mandibular nerve. *Journal of New York* 188, 51-68.
- Menna-Barreto, Y. and Araújo, A.M., 1985. Evidence for host plant preferences in *Heliconius erato phyllis* from southern Brazil (Nymphalidae). *Journal of Research on the Lepidoptera*, Arcadia 24, 41-46.
- Mugrabi-Oliveira, E. and Moreira, G. R. P., 1996a. Conspecific mimics and low hostplant availability reduce egg laying by *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 13, 929 –937.
- Mugrabi-Oliveira E. and Moreira, G.R.P., 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.
- Paul, J. and Gronenberg, W., 2002. Motor control of the mandible closer muscle in ants. *Journal of Insect Physiology*, Oxford 48, 255-267.
- Périco, E. and Araujo, A.M., 1991. Suitability of host plants (Passifloraceae) and their acceptableness by *Heliconius erato* and *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolución Biológica* 5, 59-74.

- Périco, E., 1995. Interação entre quatro espécies de Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) e suas plantas hospedeiras (Passifloraceae) em uma floresta secundária do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências*, Porto Alegre 3, 3-18.
- Price, P.W., 1997. *Insectecology*, New York. John Wiley and Sons (Eds). 874p.
- Raupp, M. J., 1985. Effects of leaf toughness on mandibular wear of the leaf beetle, *Plagioderia versicolora*. *Ecological Entomology* 10, 73-79.
- Rehder, V., 1989. Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the subesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, Philadelphia 279, 499-513.
- Rodrigues, D. and Moreira, G.R.P., 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. and Moreira, G.R.P., 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Brazilian Journal of Biology* 62, 321-322.
- Rodrigues, D. and Moreira, G.R.P., 2004. Seasonal variation in larval host-plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) adult body size. *Austral Ecology* 29, 437-445.
- Sacco, J.C., 1962. Flora ilustrada do Rio Grande do Sul – Passifloraceae. *Boletim ICN* 12, 7-29.
- Sacco, J.C., 1980. Passifloráceas. *Flora ilustrada Catarinense* 1, 3-130.

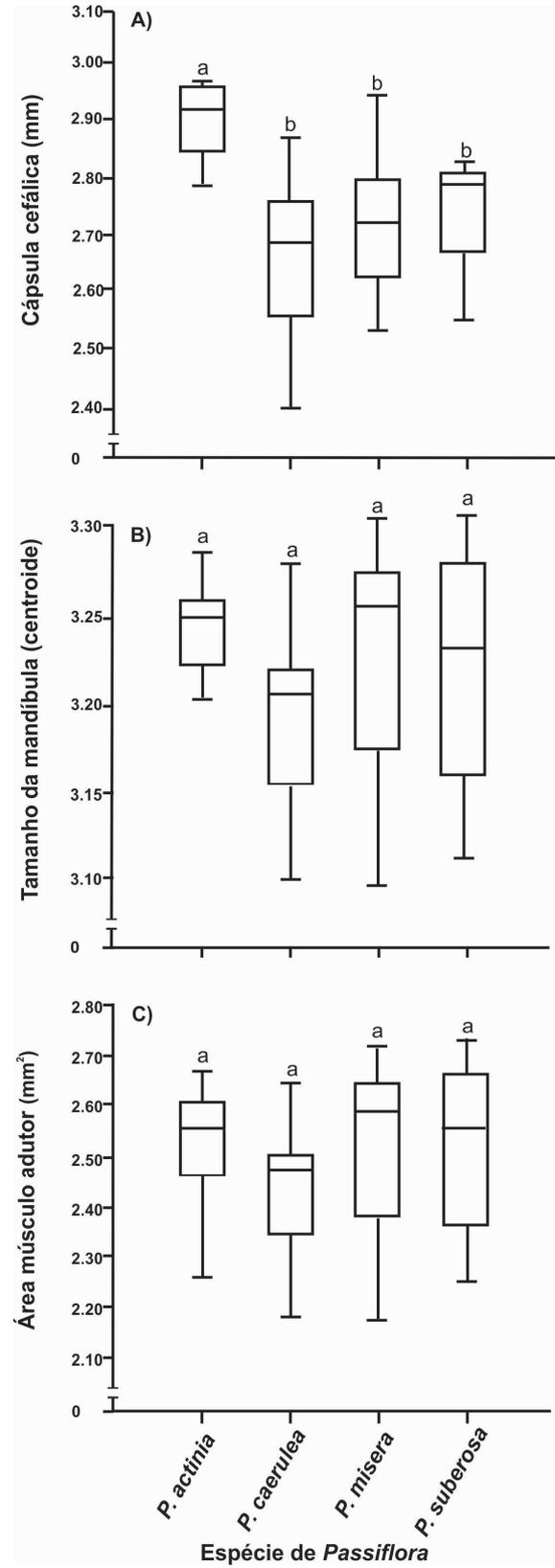
- Silveira, M.A.P.A., 2002. Variação da dureza da folha em *Passiflora*, efeito no desgaste das mandíbulas de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera: Nymphalidae) e consequências sobre a herbivoria. Porto Alegre, Dissertação de Mestrado em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 44p.
- Snodgrass, R.E., 1935. Principles of insect morphology. McGraw Hill Company, New York. 667p.
- Snodgrass, R.E., 1950. Comparative Studies on the Jaws of Mandibulate Arthropods. Smithsonian Miscellaneous Collection 116 (1), 1-85.
- Vegliante, F., 2005. Larval head anatomy of *Heterogynis penella* (Zygaenoidea, Heterogynidae), and a general discussion of caterpillar head structure (Insecta, Lepidoptera). Acta Zoologica 86, 167–194.
- Whitman, W.W. and Ananthakrishnan, T.N., 2009. Phenotypic Plasticity of insects. Mechanisms and Consequences. Science Publishers, United States of America 1. 894p.

**Tabela 1.** Análise de Variação, com valores para os testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, correspondentes às comparações entre o tamanho da cabeça de lagartas de quinto instar *Heliconius erato* criadas com folhas de 4 espécies de *Passiflora*. Asterisco indica diferenças estatísticas significativas.

p- valor testes de Dunn				
Planta hospedeira	<i>P. actinia</i>	<i>P. caerulea</i>	<i>P. misera</i>	<i>P. suberosa</i>
<b>Tamanho da cabeça (mm)</b>				
Kruskal-Wallis= 14.59				
p= 0.002201*				
<i>P. actinia</i>	-	0.00116*	0.002336*	0.001941*
<i>P. caerulea</i>		-	0.466	0.2406
<i>P. misera</i>			-	0.3176
<i>P. suberosa</i>				-

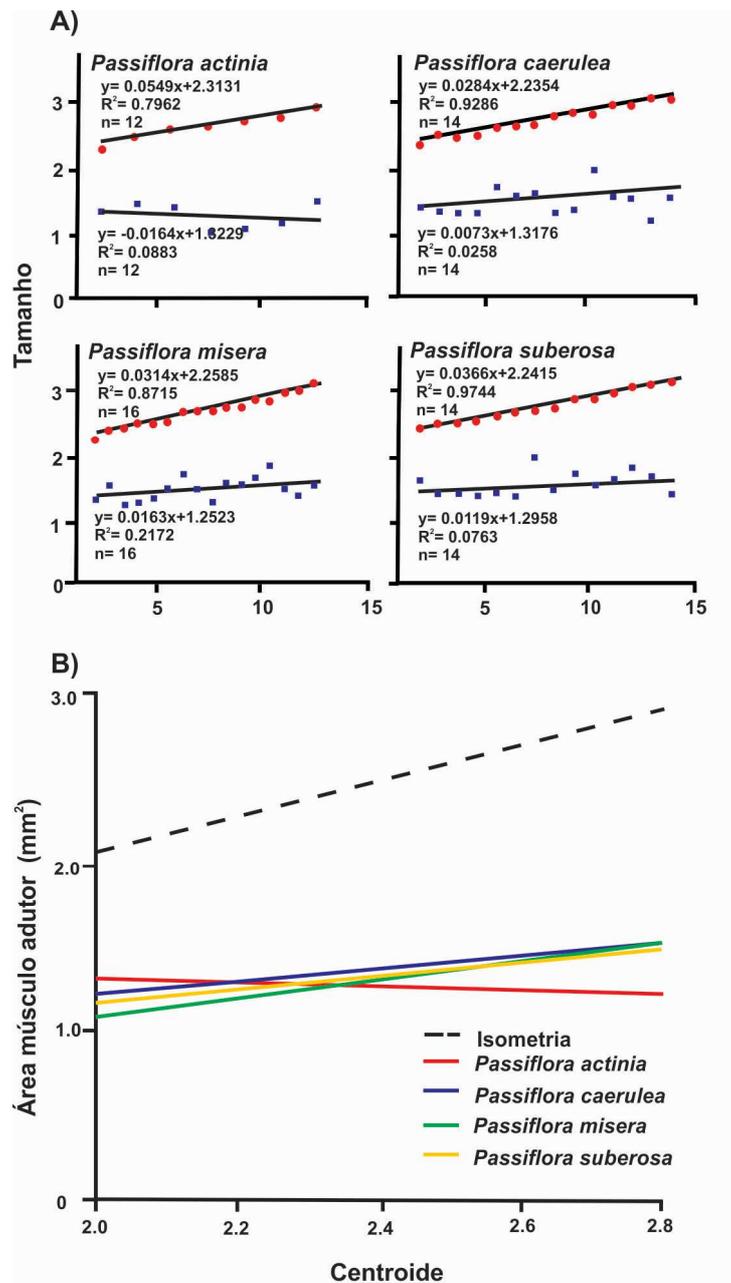
**Tabela 2.** Comparações alométricas (ANCOVAs) das inclinações ( $\beta$ ) e interceptos ( $\alpha$ ) correspondentes às retas de crescimento do músculo adutor mandibular vs. tamanho mandibular (centroide) de larvas de *Heliconius erato* alimentadas com folhas de 4 espécies de *Passiflora*. Asterisco indica diferenças estatísticas significativas.

<b>Espécie <i>Passiflora</i></b>	<b>B</b>		<b><math>\alpha</math></b>	
	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
<i>P. actínia</i>	46.6283	<0.0001*	-	-
<i>P. caerulea</i>	12.1794	0.0009037*	-	-
<i>P. misera</i>	12.8187	0.0006676*	-	-
<i>P. suberosa</i>	16.9249	0.0001184*	-	-

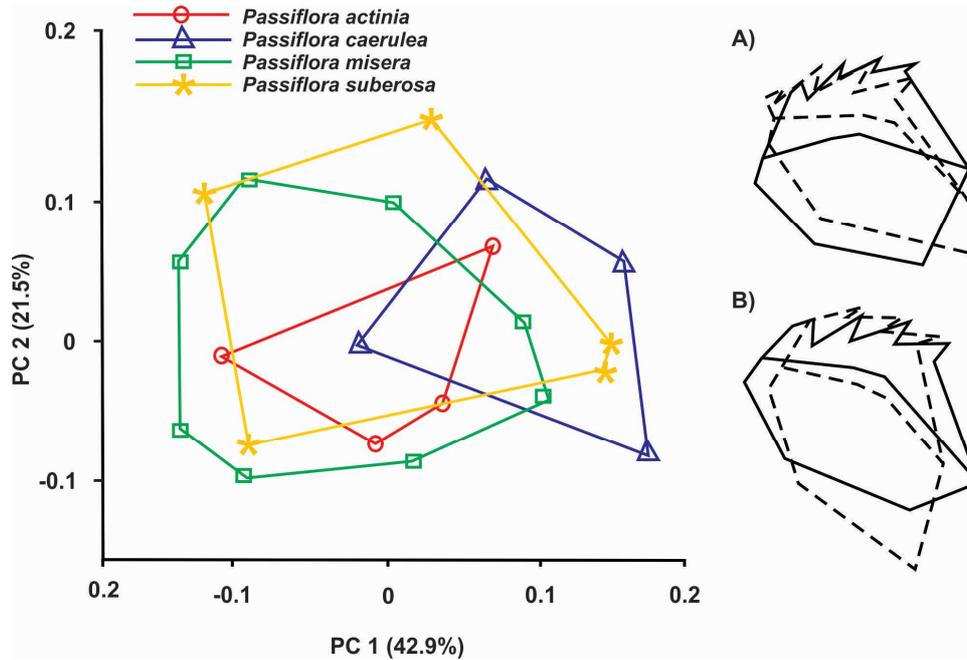


**Fig. 1**

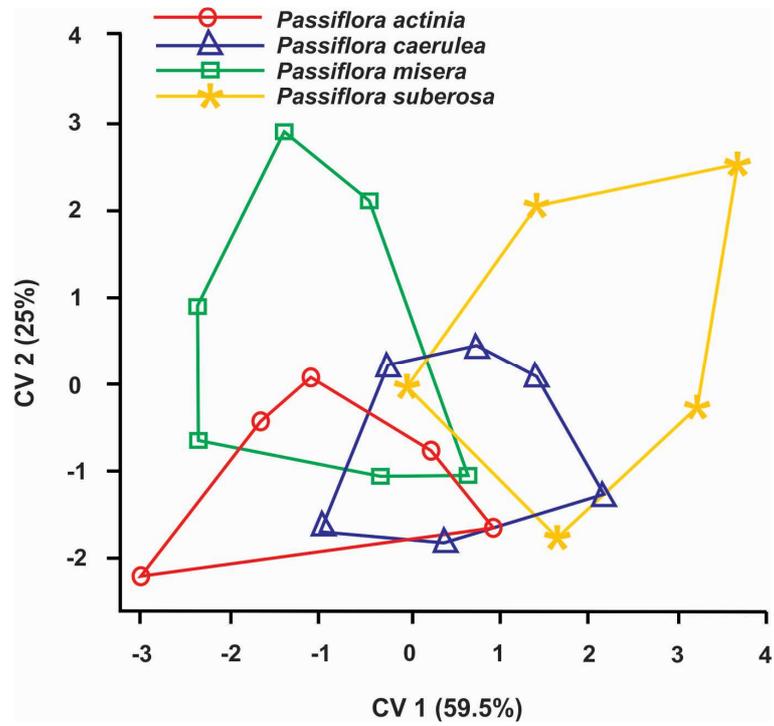
Millan et al. 90 mm



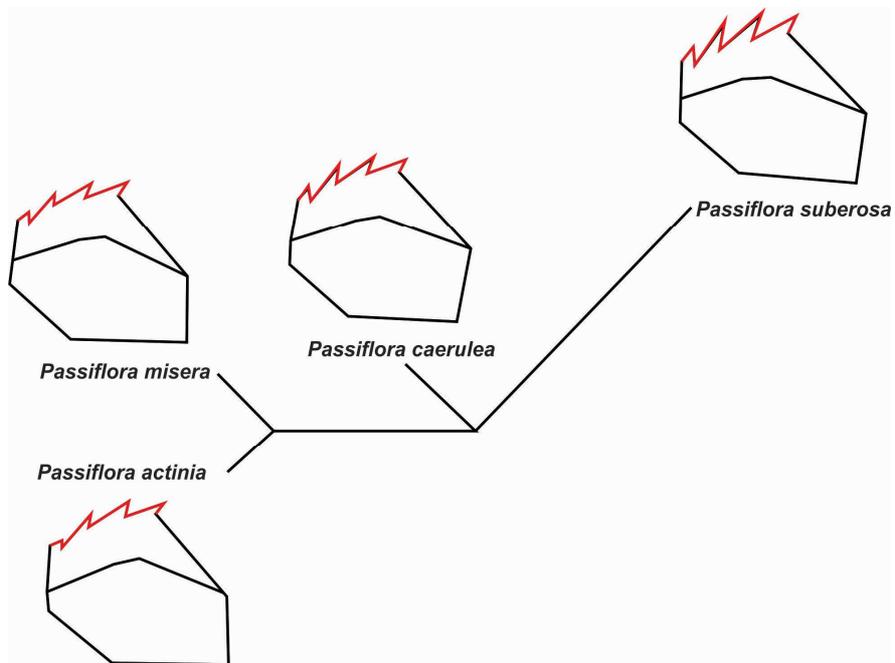
**Fig. 2**  
 Millan et al. 90 mm

**Fig. 3**

Millan et al. 140mm



**Fig. 4**  
**Millan et al. 140mm**



**Fig. 5**  
Millan et al. 140mm

## Lista de tabelas

**Tabela 1.** Análise de Variação, com valores para os testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, correspondentes às comparações entre o tamanho da cabeça de lagartas de quinto instar *Heliconius erato* criadas com folhas de 4 espécies de *Passiflora*. Asterisco indica diferenças estatísticas significativas.

**Tabela 2.** Comparações alométricas (ANCOVAs) das inclinações ( $\beta$ ) e interceptos ( $\alpha$ ) correspondentes às retas de crescimento do músculo adutor mandibular vs. tamanho mandibular (centroide) de larvas de *Heliconius erato* alimentadas com folhas de 4 espécies de *Passiflora*. Asterisco indica diferenças estatísticas significativas.

## Lista de figuras

**Figura 1.** Tamanho da A) cápsula cefálica, B) mandíbula e C) área do músculo adutor mandibular de lagartas de quinto instar de *H. erato* alimentadas com folhas de 4 espécies de *Passiflora*. Box plots com letras diferentes diferem estatisticamente (Kruskal-Wallis, seguido de testes de Dunn,  $p < 0.05$ ).

**Figura 2.** A) Retas de crescimento do centróide mandibular (círculos vermelhos preenchidos) e área do músculo adutor da mandíbula (quadrados azuis preenchidos) de lagartas de quinto instar de *H. erato* criadas em 4 espécies de *Passiflora*; B) Variação da área do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular dos indivíduos. Comparações entre as retas correspondentes à área do músculo e a reta do tamanho mandibular em cada hospedeiro, usando o total de dados, apresentam diferenças significativas quanto à inclinação (ANCOVAs,  $p < 0.0001$ ).

**Figura 3.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas em quatro espécies de *Passiflora*. **A)** e **B)** representam as deformações obtidas por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), respectivamente. Há diferenças estatísticas dentre as formas mandibulares dos indivíduos criados nas quatro espécies vegetais (MANOVAs,  $p < 0.0001$ ).

**Figura 4.** Análise discriminante (LDA) das formas mandibulares de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas em quatro espécies de *Passiflora*. CV1 e CV2 representam as variáveis canônicas 1 e 2, respectivamente. Há diferenças significativas dentre as formas mandibulares dos indivíduos criados nas quatro espécies vegetais (MANOVAs,  $p < 0.0001$ ).

**Figura 5.** Árvores Neighbor-Joining (não enraizadas) das distâncias fenotípicas de Mahalanobis para forma mandibular de larvas de quinto instar de *H. erato* alimentadas com folhas de quatro espécies de *Passiflora*. As ilustrações mandibulares associadas a cada planta hospedeira correspondem à forma média obtida por sobreposição de Procrustes (GPA) dos indivíduos criados em cada hospedeiro. Os ápices observados na parte mais externa da área incisora, ressaltados em vermelho, correspondem às bases dos dentes mandibulares sendo que as pontas destes estão localizadas na parte interna, e se curvam em direção à área molar no quinto instar dos heliconíneos.

### CAPITULO 3.

## INFLUÊNCIA DA IDADE DA FOLHA E GREGARIEDADE NO TAMANHO E FORMA MANDIBULAR EM HELICONIINI (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE).

Carolina Millan<sup>1</sup>, Rodrigo Fornel<sup>2</sup>, Gilson R.P. Moreira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500,91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil,  
lepidoptera.azul@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Ciências, Laboratório de Ecomorfologia, Animal, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Rua Sete de Setembro, 1621, 99700-000, Erechim, Brasil,  
[rodrigofoanel@hotmail.com](mailto:rodrigofoanel@hotmail.com)

<sup>3</sup>Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves 9500,91501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil,  
gilson.moreira@ufrgs.br

### RESUMO

As borboletas da tribo Heliconiini são reconhecidos dois padrões alimentares resultantes do nível de gregariedade e idade da folha consumida. O primeiro pode ter surgido de forma independente pelo menos três vezes na filogenia, enquanto o segundo associa o consumo de folhas jovens do hospedeiro às espécies mais derivadas e o consumo de

folhas maduras às espécies menos derivadas. Estudos sobre os benefícios e desvantagens conferidas pela adoção desses padrões alimentares por parte das espécies são escassos, mas os existentes sugerem que a gregariedade confere uma maior sobrevivência larval às espécies que possuem o hábito (Bianchi e Moreira 2005); e, por outro lado, o consumo condicionado a folhas velhas por indivíduos das espécies mais derivadas, conduzem a altas mortalidades. A identificação dos mecanismos correspondentes associados a forma e tamanho da mandíbula larval constituem-se no objetivo principal desse estudo. Para avaliar supostas mudanças alométricas e de forma nas estruturas alimentares dos Heliconiini a razão da gregariedade larval, criações usando diferentes densidades larvais das espécies de hábito gregário *Dione juno* (menos derivada) e *Laparus doris* (mais derivada) foram realizadas e posteriormente analisadas as mandíbulas dos indivíduos quanto ao tamanho e a forma. Adicionalmente e para determinar possíveis mudanças nas estruturas alimentares à idade da folha consumida, foram conduzidas criações de indivíduos de *Heliconius erato*, espécie naturalmente restrita ao consumo folhas jovens, em folhas maduras do hospedeiro e posteriormente analisadas suas mandíbulas quanto aos mesmos parâmetros. Os resultados sugerem que a diminuição da densidade larval acarreta custos elevados quanto à sobrevivência para larvas de *L. doris*, e alterações de tamanho e forma nas estruturas alimentares em larvas de *D. juno*. Por outro lado, o consumo de folhas velhas por parte de larvas jovens de *H. erato* embora não acarrete alterações de forma nas mandíbulas, originou mudanças no tamanho do músculo adutor mandibular, que é quem proporciona força às mandíbulas.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Heliconíneos e Passifloráceas**

As borboletas do maracujá são amplamente estudadas devido à sua participação em anéis miméticos, coloração aposemática, variada distribuição geográfica e pela estrita relação que apresentam com suas plantas hospedeiras (passifloráceas). Nesse sentido, passifloráceas e heliconíneos se destacam como um exemplo de evolução conjunta (Gilbert 1975, 1991; Benson et al. 1976; Futuyma 2000); encontrando-se amplamente distribuídos na região Neotropical (Brown e Mielke 1972; Brown 1981). Atualmente, a tribo Heliconiini (Lepidoptera: Nymphalidae) possui cerca de 70 espécies distribuídas em 10 gêneros: *Agraulis* Boisduval & Le Conte, *Dione* Hübner, *Dryadula* Michener, *Dryas* Hübner, *Eueides* Hübner, *Heliconius* Kluk, *Laparus* Billberg, *Neruda* Turner, *Philaethria* Billberg e *Podotricha* Michener (Brown 1981), entre dos quais *Agraulis*, *Dione*, *Dryas*, *Podotricha* e *Dryadula* são considerados menos derivados e *Heliconius* e *Laparus* gêneros mais derivados (Beltran et al. 2007).

Por outro lado, o gênero *Passiflora* possui atualmente 530 espécies em 23 subgêneros (Ulmer e MacDougal 2004). No Brasil, estima-se que existem aproximadamente 130 espécies, com uma maior representatividade na Amazônia (Killip 1938, Cervi 1997). O gênero *Passiflora* é subdividido em quatro subgêneros: *Astropheia* (DC) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC) Rchb e *Passiflora* L (Feuillet e MacDougal 2003). Na região Sul do Brasil ocorrem 23 espécies aproximadamente, onde o subgênero *Decaloba* e *Passiflora* são os mais abundantes; em dita região o primeiro gênero está maiormente representado pelas espécies *Passiflora cápsularis* Linnaeus, *Passiflora misera* Humboldt, Bonplant e Kant e *Passiflora suberosa* Linnaeus e o segundo representado pelas espécies *Passiflora actinia* Hooker, *Passiflora alata* Dryander, *Passiflora caerulea* Linnaeus, *Passiflora edulis* Sims, *Passiflora elegans* Masters e *Passiflora tenuifila* Killip (Killip 1938, Sacco 1980, Cervi 1997, Mondin 2001, Milwad-De-Azevedo e Baumgratz 2004). Filogeneticamente, o gênero *Passiflora*

e o gênero *Dysomia* formam um clado irmão com o gênero *Decaloba*, sendo o último considerado o mais derivado (Mondin et al. 2011).

## **1.2. Interação Heliconiini – Passifloraceae e os padrões alimentares adotados pelas borboletas do maracujá.**

Os heliconíneos se alimentam principalmente de passifloráceas durante sua fase larval; espécies menos derivadas se alimentariam de passifloráceas primitivas enquanto espécies mais derivadas utilizariam passifloráceas derivadas como hospedeiras (e.g. maioria das espécies do gênero *Heliconius*, considerado mais derivado, que usam plantas do subgênero *Decaloba*) (Benson 1976).

Além da alta especificidade e preferência de hospedeiros por parte das fêmeas dos heliconíneos, são reconhecidas altas restrições alimentares; ditas restrições confinam a algumas espécies a condições especiais enquanto outras são mais plásticas frente ao uso do recurso alimentar. No grupo, reconhece-se uma tendência geral na qual as espécies menos derivadas (*Agraulis*, *Dione*, *Philaethria*, *Podotricha*, *Dryas* e *Dryadula*) alimentam-se das folhas velhas do hospedeiro enquanto as espécies mais derivadas (*Heliconius*, *Eueides*, *Neruda* e *Laparus*) estão associadas ao consumo das folhas jovens, exibindo assim padrões alimentares diferenciados (Benson 1976). Ditos padrões são reconhecidos na literatura como determinados pela Idade da folha consumida e Nível de agregação/gregariedade (Benson 1976).

Os danos que os tecidos maduros produzem em estruturas bucais dos insetos herbívoros estão associados supostamente à maior dureza e alto conteúdo de fibras nesses. Alexander (1961) em estudos descritivos sobre as mandíbulas de seis espécies de heliconíneos e a forma como eles se alimentam, observou que a mandíbula de

*Heliconius erato*, que se alimenta de folhas jovens inicialmente, apresentava uma região incisória com dentes mais amplos e definidos do que *Dione junco*, que se alimenta só de folhas maduras (mais rígidas), o que supostamente representa um aparelho bucal menos eficiente em relação ao primeiro, frente ao tipo de folhas utilizado.

Nesse sentido, *H. erato*, que oviposita preferencialmente em folhas jovens (Mugrabi-Oliveira e Moreira 1996), seria um exemplo claro de espécie derivada e restrita quanto ao hábito alimentar. Rodrigues e Moreira (1999) demonstraram que larvas dessa espécie dependem das folhas jovens da hospedeira, apresentando uma alta mortalidade quando criadas em folhas velhas. Os autores atribuíram tal fato à incapacidade das larvas jovens para consumir o tecido duro característico de folhas maduras. Adicionalmente, Silveira (2002) e Elpino-Campos (2010) em estudos referentes às consequências do consumo de passifloráceas no desgaste mandibular dessa espécie, evidenciaram que a morfologia mandibular de larvas jovens é parcialmente adaptada para o consumo de folhas tenras e que o desgaste mandibular destas é maior quando aumentada a rigidez da hospedeira. Por outro lado, Millan et al. (2013) demonstraram que *D. iulia*, espécie considerada basal, desenvolveu-se exitosamente tanto em folhas jovens quanto em folhas velhas de *P. suberosa*, sendo considerada um heliconíneo altamente plástico quanto à idade da folha consumida pelas larvas.

Na tribo Heliconiini existem também diferentes níveis de sociabilidade podendo ser classificadas em: solitárias, semi-gregárias ou gregárias (Brown 1981). O hábito gregário acontece em cerca de 50% das espécies dos gêneros *Dione*, *Eueides*, *Heliconius*, *Laparus* e *Neruda* e é considerado um caráter derivado, tendo evoluído independentemente pelo menos três vezes dentro do grupo (Beltrán et al. 2007). A diferença consiste em que outros grupos apresentam hábito gregário às quais tem sido atribuídos efeitos benéficos como aceleração do desenvolvimento (Reader et al. 2003) e

proteção a inimigos naturais (Hunter 2000), entre outros. A gregariedade nas borboletas do maracujá afeta fortemente a sobrevivência de *Dione juno*, principalmente nos instares iniciais, quando a agregação é maior e pode estar associada à facilitação alimentar, o que resta a ser explorado (Bianchi e Moreira 2005), assim como precisam ser conduzidos experimentos que avaliem as consequências do nível de agregação em outras espécies de Heliconiini que apresentam dito hábito.

### **1.3. Idade da folha consumida e o nível de agregação dos heliconíneos e sua influência na evolução das estruturas corpóreas.**

Padrões de desenvolvimento em conjunto com a história de vida e a seleção natural sofrida pelos indivíduos ao longo da ontogênese devem explicar, pelo menos em parte, a evolução morfológica em diferentes níveis taxonômicos (Beldade et al. 2002; Smith 2003; Nijhout 2008). A teoria que junta aspectos da biologia evolutiva e do desenvolvimento das espécies é chamada por diversos autores de “Evo-Devo” (Atkison 1992; Hall et al. 2003; Brakefield 2006) sendo possível a conexão entre ontogenia e evolução.

Estudos referentes à variação das formas corpóreas frente aos hábitos alimentares dos heliconíneos são escassos. Aymone (2006) avaliou a cápsula cefálica de larvas de *H. erato*, concluindo que há variações alométricas possivelmente associadas à variação comportamental ao longo da ontogênese, assim como também constatou crescimento do músculo adutor das mandíbulas frente ao aumento da rigidez foliar do hospedeiro, refletindo se nas deformações externas da cápsula cefálica da espécie.

Posteriormente, Aymone (2009) em estudos complementares usando sete espécies de heliconíneos do RS, além de *H. erato*, evidenciou que tanto a nível ontogenético como filogenético, as espécies avaliadas sofreram variações na forma da cápsula cefálica, ressaltando o fato interessante de que as análises das relações

resultantes da forma não corroboraram a filogenia molecular reconhecida para o grupo (Beltrán et al. 2007). Assim, diferenças na forma das cápsulas cefálicas diretamente associadas a hábitos alimentares, indicam a presença de convergências que podem ser guiadas por restrições ontogenéticas (*e.g.* tamanho) e / ou ecológicas (*e.g.* diferentes hospedeiras, comportamento), o que resta a ser testado. Estudos que levem em conta tais restrições e que avaliem as mudanças na forma, tamanho e taxas de crescimento das estruturas diretamente relacionadas com processos de alimentação, mandíbulas e músculo adutor são inexistentes e, portanto, constituem o principal foco deste estudo.

Avaliamos a possível existência de plasticidade fenotípica ao nível de forma/tamanho da mandíbula e tamanho do músculo adutor mandibular de larvas de *H. erato*, inicialmente restritas ao consumo de folhas jovens na natureza, quando criadas em folhas maduras de *P. suberosa* (comportamento condicionado). Trabalhamos sob a hipótese de que o consumo obrigatório de folhas velhas desde o início do desenvolvimento influencia a forma e tamanho exibidos pela mandíbula e modifica a estrutura do músculo adutor das lagartas no fim da ontogênese larval, evidenciando a existência de plasticidade fenotípica.

Adicionalmente, foi avaliada a possibilidade de modificações ao nível de forma/tamanho mandibulares e ao tamanho da área do músculo adutor de lagartas das espécies gregárias *D. juno* (menos derivada) e *L. doris* (mais derivada) quando criadas em diferentes densidades sobre a planta hospedeira respectiva. Neste caso, trabalhamos sob a hipótese de que o hábito gregário não influenciaria a forma da mandíbula nem do músculo adutor nesses heliconíneos, sendo plausível afirmar que a alta sobrevivência a altas densidades larvais observada por Bianchi e Moreira (2005) estaria relacionado a um efeito de “facilitação alimentar”; benefício que, segundo os autores, envolveria aspectos exclusivamente comportamentais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Criação de larvas

As larvas de *D. juno* e *L. doris* utilizadas nos experimentos foram obtidas de ovos de fêmeas mantidas em insetario, previamente coletadas em diferentes locais dos municípios de Porto Alegre, RS (Brasil) e o município dos Bolos, em Palmira (Colômbia). Foram criadas em condições ambientais controladas de laboratório, no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. As larvas foram alimentadas *ad libitum*, em diferentes densidades, sobre ramos de *Passiflora edulis* Sims (n=152) e *Passiflora maliformis* Linnaeus (n=470), respectivamente, que foram obtidas de uma criação de passifloras existente no local.

Para avaliar o efeito da densidade larval na estrutura mandibular de heliconíneos gregários e com o fim de realizar comparações entre espécies mais derivadas e menos derivadas que possuem dito hábito, foram necessários experimentos complementares da sobrevivência de *Laparus doris* (mais derivada) em *Passiflora maliformis*, seguindo o procedimento adotado por Bianchi e Moreira (2005) em estudo realizado com *Dione juno* (menos derivada) em *Passiflora edulis*; cujos resultados foram utilizados em comparação neste trabalho.

Previamente à eclosão das lagartas, foram estabelecidos grupos de 1 (10 repetições), 2 (10 repetições), 4 (16 repetições), 8 (12 repetições) e 16 (8 repetições) ovos de *L. doris* dispostos em potes plásticos contendo folhas frescas de *P. maliformis*. Diariamente foi trocado o alimento, quando necessário e contabilizada a mortalidade dos indivíduos até a emergência dos adultos.

Após a obtenção de dados de sobrevivência descritos acima, larvas recém-eclodidas das espécies *L. doris* e *D. juno* foram submetidas a criações simultâneas em folhas do hospedeiro correspondente, até o quinto instar, em três diferentes densidades larvais: 4 (10 repetições/espécie), 8 (6 repetições/espécie) e 16 indivíduos (4 repetições/espécie). A seguir, as lagartas sobreviventes até o quinto instar (*Dione juno*, n=38, *Laparus doris*, n=32) foram fixadas e analisadas quanto às consequências das diferentes densidades larvais na variação do tamanho das mandíbulas vs. o tamanho do músculo adutor mandibular, assim como possíveis mudanças na forma das mandíbulas, conforme será descrito posteriormente.

O segundo experimento avaliou possíveis alterações nas taxas de crescimento mandibular e do músculo adutor mandibular, assim como possíveis mudanças da forma da mandíbula de *Heliconius erato* com respeito à idade da folha consumida. Para isto, indivíduos da espécie foram criados até o quinto instar em folhas jovens de *Passiflora suberosa* (n=15) das posições L2 a L4 do ramo (Rodrigues e Moreira 1999; situação natura para a espécie) e folhas L6 a L9 do ramo, consideradas como folhas maduras (n=16) (condicionamento). Após dois dias no quinto instar, as larvas foram fixadas e analisadas quanto à variação no tamanho dos músculos adutores mandibulares vs. o tamanho das mandíbulas e analisada a forma mandibular conforme os procedimentos de fixação, análises alométricas e morfométricas descritas a seguir.

## **2.2. Fixação, dissecação e análises da mandíbula**

Após ter atingido o quinto instar larval, todas as lagartas de *D. juno*, *L. doris* e *Heliconius erato* sobreviventes dos experimentos respectivos foram fixadas em Dietrich e preservadas em álcool 70%. As cápsulas cefálicas foram dissecadas e subdivididas por corte sagital central. Usando a metade esquerda, foi medida a distância da inserção do

côndilo anterior à base do escolo dorsal. Para observação das mandíbulas, as cabeças dos indivíduos foram dispostas em posição horizontal sobre lâmina de microscopia coberta com fita branca de dupla face para garantir fixação, utilizando-se os côndilos mandibulares como referência. Posterior à montagem, todas as mandíbulas foram fotografadas em vista frontal com câmera digital Nikon® DS-U3 montada em um microscópio Nikon® AZ100M, usando o software de imagem NIS-Elements para posteriores análises alométricas e morfométricas.

Vouchers correspondentes encontram-se depositados na coleção do Laboratório de Morfologia e Comportamento de Insetos (LMCI) da UFRGS, sob o código de acesso LMCI 250.

### **2.3. Análises morfométricas.**

Ao não serem cumpridos os pressupostos de normalidade (Testes Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Testes de Hartley), as comparações de comprimento das cabeças, tamanho das mandíbulas e músculos adutores mandibulares foram analisados com estatística não paramétrica. A presença de alometria nas mandíbulas e músculos adutores das larvas de quinto instar foi testada por meio da correlação de Pearson e ANCOVA (GraphPad Prism 5.00) entre as retas de crescimento correspondentes.

A digitação de marcos anatômicos mandibulares e sua localização em coordenadas cartesianas foi feita sobre fotos utilizando o programa TPSdig 2.16 (Rohlf 2010), sendo considerados 17 marcos anatômicos Tipo I, levando-se em consideração as regiões anatômicas de interesse conforme descrito por Millan et al. 2016 (submetido).

As análises foram feitas utilizando PCA e MANOVA obtidas no programa “R” por meio dos pacotes MASS, Ape, ade4 e stats (Development Core Team 2008) e a forma mandibular analisada com o método de sobreposição de Procrustes (Rohlf e Slice

1990). Para explicar as variáveis, foram utilizadas análises de componentes principais (PCA) com os resíduos de Procrustes. Com esses resíduos testamos a significância da variação ontogenética e filogenética da forma, usando análises multivariadas de variância (MANOVA).

Foram feitas análises de deformações relativas (Rohlf 2006) graficamente através da função “Thin Plate Splines” (Adams e Rosenberg 1998). As relações de proximidade fenotípica foram estabelecidas através de distâncias de Mahalanobis (1936) e árvores Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987) não enraizadas.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Habito alimentar: Gregariedade**

A sobrevivência de *Laparus doris* em *Passiflora maliformis* foi nula nas densidades larvais de 1 e 2 indivíduos, e exibiu valores estatisticamente diferentes entre as densidades larvais de 4, 8 e 16 indivíduos (Qui-quadrado 23.12,  $p < 0.001$ ) (Fig. 1).

No que se refere ao tamanho da cápsula cefálica, mandíbula e músculo adutor mandibular de lagartas de *Dione juno* criadas em diferentes densidades encontramos que as larvas do grupo de maior densidade apresentaram cabeças e mandíbulas significativamente menores (Tabela 1) e a área do músculo adutor mandibular exibiu uma tendência a ser menor nesses indivíduos (Kruskal-Wallis= 2.569,  $p = 0.2768$ ) (Fig. 2A). Indivíduos de *Laparus doris*, independentemente da densidade larval na que foram criados, exibiram cabeças similares (Kruskal-Wallis= 3.308,  $p = 0.1913$ ) e mandíbulas de tamanhos semelhantes (Kruskal-Wallis= 1.786,  $p = 0.4092$ ), e adutor mandibular ser maior em indivíduos criados à menor densidade larval (Kruskal-Wallis= 5.128,  $p = 0.0770$ ) (Fig. 2B).

De forma geral, o comportamento das curvas referentes ao tamanho das mandíbulas e seus respectivos músculos adutores em indivíduos de quinto instar de ambas as espécies mostrou que a medida que aumenta a densidade larval de criação, os músculos adutores mandibulares dos indivíduos crescem proporcionalmente menor que as mandíbulas (Fig. 3A). Comparações entre as retas correspondentes ao crescimento da mandíbula e músculo adutor mandibular de lagartas de *Dione juno* criadas em densidades de 4, 8 e 16 indivíduos tiveram suas inclinações e/ou interceptos estatisticamente diferentes e apresentaram coeficientes alométricos negativos ( $\beta < 1$ ) (Tabela 2). Retas equivalentes para indivíduos de *Laparus doris* também exibiram coeficientes alométricos negativos e quando comparadas com o tamanho mandibular, o tamanho do músculo adutor de lagartas criadas à densidade larval de 16 mostraram inclinações significativamente diferentes, enquanto nas densidades 4 e 8, respectivamente, apresentaram diferenças nos interceptos (Tabela 2) (Fig. 3B).

Os componentes principais (PCA) das formas mandibulares de lagartas de *Dione juno* exibiram diferenças estatísticas significativas entre os indivíduos criados nas três diferentes densidades (MANOVAs,  $F=13.703$ ,  $p=0.00989$ ) (Fig. 4A) da mesma forma que *Laparus doris* (MANOVAs,  $F= 15.986$ ,  $p= 0.0036$ ) (Fig. 4B). Indivíduos de *Dione juno* criados em densidades larvais de 4, 8 e 16 apresentaram porcentagens de identificação correta de 92.31%, 85.71% e 63.64%, respectivamente; enquanto lagartas de *Laparus doris* porcentagens de identificação correta de 97.14%, 88.53% e 86.39%, respectivamente.

A topologia da árvore fenotípica de distâncias de Mahalanobis mostra que mandíbulas de indivíduos de *Dione juno* criados em densidades larvais de 4, 8 e 16 indivíduos são diferentes entre si (Fig. 5A); enquanto larvas de *Laparus doris* criadas em densidades de 8 e 16 indivíduos possuem mandíbulas mais parecidas entre si do que

indivíduos criados em densidade 4, que estão afastados fenotipicamente do resto do grupo (Fig. 5B).

### **3.2. Hábito alimentar: Idade da folha.**

O tamanho da cabeça e mandíbula de lagartas de quinto instar de *H. erato* alimentadas com folhas jovens e maduras de *Passiflora suberosa* não exibiu diferenças significativas. Por outro lado, a área do músculo adutor de larvas alimentadas com folhas maduras foi significativamente maior do que em larvas que consumiram folhas velhas (Fig. 6) (Tabela 3).

As retas correspondentes à variação da área do músculo adutor mandibular com relação ao tamanho das mandíbulas dos indivíduos de quinto instar criados nas duas idades do hospedeiro apresentaram coeficientes alométricos negativos tanto em folhas jovens como em folhas velhas, e em ambos os tratamentos houve diferenças significativas entre as inclinações quando comparados com a reta do tamanho da mandíbula (Tabela 4) (Fig. 7).

A análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares de larvas criadas em folhas jovens e maduras do hospedeiro não apresentou diferenças estatísticas significativas (MANOVAs,  $F= 18.43$ ,  $p=0.1812$ ) (Fig. 8).

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Efeitos da gregariedade nas estruturas alimentares dos Heliconiini.**

Para as larvas de *L. doris*, os efeitos da privação da condição gregária aparentemente são muito mais acentuados pois, embora não foram evidenciadas mudanças de tamanho nas estruturas alimentares nem mudanças tão acentuadas na forma das mandíbulas como em larvas de *D. juno*, o custo da criação em baixas

densidades se expressa logo no início do desenvolvimento, onde houve uma mortalidade larval do 100% quando as larvas foram criadas sozinhas ou em duplas. Nesse sentido, podemos afirmar que os benefícios do hábito gregário são muito maiores para *L. doris*, onde a sobrevivência dos indivíduos solitários se vê comprometida logo no início do desenvolvimento enquanto larvas de *D. juno*, embora com custos energéticos altos, continuam seu desenvolvimento até a obtenção de adultos (Bianchi e Moreira 2005).

Os custos e benefícios da vida em grupo para insetos em geral têm sido debatidos por muitos anos e incluem proteção contra inimigos naturais (Schultz 1983, Benrey e Denno 1997), localização dos companheiros da mesma espécie, utilização mais eficientes de recursos por facilitação alimentar (Ghent 1960, Petersen 1987), melhor termoregulação e perda de água reduzido (Seymour 1974). Em contraste, existem desvantagens documentadas como o maior risco de doenças infecciosas (Hochberg 1991), aumento da competição por alimento (Damman 1991, Le Masurier 1994) e maior visibilidade aos predadores (Le Masurier 1994). Levando em conta que qualquer efeito alusivo às condições mencionadas (exceto o efeito de “facilitação alimentar” que é intrínseco ao comportamento gregário) foi isolado e controlado por nós em laboratório, a vida em grupo devia ocasionar efeitos parecidos para *D. juno* e *L. doris*, o que não foi corroborado. Portanto, a utilização mais eficiente de recursos por uma suposta facilitação alimentar, própria à trajetória evolutiva de cada espécie, seria a condição determinante que estaria exercendo a resposta diferenciada observada na sobrevivência e as estruturas alimentares desses dois heliconíneos.

As diferenças entre as inclinações e/ou interceptos equivalentes ao crescimento das mandíbulas e músculo adutor mandibular das lagartas de quinto instar indicou que

essas duas estruturas crescem diferencialmente, nas três densidades larvas estudadas, tanto em larvas de *D. juno* quanto em larvas de *L. doris* e as relações alométricas de crescimento do músculo adutor em relação à mandíbula, em ambas as espécies, sugerem músculos adutores crescendo proporcionalmente menos em indivíduos criados na maior densidade, enquanto em densidades menores o músculo adutor dos indivíduos acompanha o crescimento mandibular. Larvas criadas em grupos maiores investiram proporcionalmente menos no crescimento do músculo adutor em relação à mandíbula (cujo crescimento é constante), possivelmente devido a que a alimentação em grupo estaria auxiliando na ingestão e mastigação do tecido vegetal de maneira que músculos adutores mais fortes e portanto mais robustos não seriam requeridos (Bernays 1896). Ao contrário disso, a tendência de crescimento observada nos músculos adutores de larvas criadas em densidades menores sugere que a força e robustez mandibulares nesses indivíduos são necessárias.

Demonstramos também que as mandíbulas de larvas de *D. juno* e *L. doris* adotam formas diferentes quando submetidas a criações em diferentes densidades. Lagartas da primeira espécie criadas na maior densidade exibiram mandíbulas com dentes incisores evidentemente mais aplanados do que nos outros tratamentos; em *L. doris*, embora o efeito foi similar, apresentou-se menos evidente. Assim, o custo da criação a baixas densidades larvais é alto para *D. juno* pois precisou investir em indivíduos com cabeças e mandíbulas maiores do que os criados em grupos maiores (condição natural), assim como em indivíduos com dentes mais conspícuos; presumivelmente essas condições permitem às larvas, desprovidas da condição natural gregária, lidar mais facilmente com alimento rígido próprio das folhas maduras das quais eles se alimentam.

Trabalhos de Reader et al. (2003) com *Doratifera casta* (Lepidoptera: Limacodidae) demonstraram que larvas que se desenvolveram em grupos grandes tiveram um desenvolvimento mais acelerado do que grupos pequenos e que o hábito gregário se manteve desde o primeiro instar até o terceiro instar, a partir do qual as larvas exibiram um comportamento solitário. Adicionalmente, os autores encontraram que o tamanho do grupo não teve qualquer influência detectável na sobrevivência. Nesse caso, o acelerado desenvolvimento em grupos grandes seria influenciado por fatores internos ao comportamento grupal, não explicitados e a interação com a planta hospedeira, proporcionando facilitação alimentar refletida em ciclos larvais acelerados. Levando em conta que a facilitação alimentar é entendida como um benefício meramente comportamental que favorece a sobrevivência (Bianchi e Moreira 2005) e performance larvais (Reader et al. 2003) de algumas espécies de lepidópteros de hábito gregário, e que todas essas espécies possuem mecanismos diferentes para se adaptar às condições específicas impostas pelo ambiente, se torna confuso na literatura a atribuição de um benefício específico qualquer à “facilitação alimentar” propriamente dita, pois até hoje não existem descrições detalhadas de como tal fenômeno acontece nas espécies e se fatores morfológicos estão ou não envolvidos no processo.

No estudo realizado com *D. casta*, citado acima, os autores observaram duas mudanças claras que puderam ser associadas à variação no tamanho do grupo larval. Em primeiro lugar, larvas de instares iniciais raspam as folhas da planta hospedeira deixando o esqueleto da folha exposto, enquanto instares posteriores consomem a folha inteira. Pode ser que pequenos grupos de larvas jovens sejam menos bem-sucedidas ao se alimentarem de folhas fisicamente duras do que as que se desenvolvem em grandes grupos e que a companhia de outras larvas exerceria pouca influência sobre o sucesso de

fORAGEAMENTO DE LARVAS EM INSTARES MAIS AVANÇADOS, QUE SERIAM CAPAZES DE CORTAR AS FOLHAS SOZINHAS E DE FORMA MAIS EFICIENTE.

Estudos equivalentes aos realizados em *D. Casta* em larvas de Heliconiini focaram seus esforços na avaliação da performance larval que incluem dados de duração do desenvolvimento, sobrevivência dos indivíduos, tamanho das larvas e adultos e a capacidade reprodutiva dos mesmos (Menna-Barreto e Araujo 1895, Périco e Araujo 1991, Périco 1995, Mugrabi-Oliveira e Moreira 1996 a,b, Rodrigues e Moreira 1999, Bianchi e Moreira 2005, Millan et al. 2013), como algumas descrições sobre a forma de alimentação das espécies (Alexander 1961, Millan et al. 2016). Nesses estudos, sugestões sobre qualidade de hospedeiros, e possíveis efeitos ocasionados pelos hábitos alimentares das espécies foram feitas; entre elas a evidência de uma alta sobrevivência de larvas de *Dione juno* atribuída por Bianchi e Moreira (2005) a facilitação alimentar, aparentemente comportamental, proporcionada pelo hábito gregário dessa espécie. No presente estudo, contrário ao proposto por esses autores e de forma inédita, associamos dito benefício à facilitação proporcionada diretamente pela anatomia mandibular dos indivíduos, tanto em *D. juno* como em *L. doris*.

Nas criações experimentais de 1 e 2 lagartas de *L. doris*, todos os indivíduos morreram no início do desenvolvimento e apresentaram suas mandíbulas quebradas; enquanto as criações a baixas densidades originaram indivíduos de *D. juno* com tendência a ter cabeças, mandíbulas e músculos adutores maiores, o que sugere que em condições naturais, onde ocorrem altas densidades larvais (Constantino et al. 2005), a facilitação tenha a ver com a fragmentação e/ou amolecimento do material vegetal, por pré-mastigação, por parte das larvas vizinhas, de maneira que é possível para uma larva jovem pertencente ao grupo aproveitar o alimento sem ocasionar danos/modificações no

aparelho alimentar. Embora as mandíbulas dos indivíduos estudados sugerem como o processo alimentar exitoso em grupo aconteceria, estudos mais detalhados que avaliem o comportamento de alimentação dos indivíduos de ambas as espécies são necessários para esclarecer como a ingestão dos tecidos acontece.

Por outro lado, mudanças da forma das mandíbulas em ambas as espécies e em todas as densidades experimentais foram corroboradas. Millan et al. (2016) demonstraram que larvas de *L. doris* apresentam mandíbulas do tipo cortador no início da ontogênese, as quais vão se tornando “ raspadoras” à medida que avança o desenvolvimento; ao contrário do que ocorre em indivíduos do gênero *Heliconius*, que apresentam mandíbulas cortadoras até o fim da ontogênese, e com os quais compartilha uma relação filogenética mais derivada. Os autores associaram dita transição de mandíbulas cortadoras para raspadoras ao hábito gregário de *L. doris*, pois as mandíbulas dos indivíduos no fim do desenvolvimento foram convergentes em forma com as mandíbulas de *D. juno*, espécie isolada filogeneticamente e menos derivada, mas cujos indivíduos também possuem mandíbulas raspadoras e hábito gregário.

A diferença dos *Heliconius*, larvas de *L. doris* conseguem se alimentar de folhas mais maduras do hospedeiro desde o início do desenvolvimento. Desde o ponto de vista comportamental, essa capacidade de consumo deve ter sido moldada na trajetória evolutiva da espécie devido ao hábito de postura gregária adotado. As fêmeas de *L. doris* realizam posturas que vão dos 30 aos 65 ovos (Constantino et al. 2005) que são colocados em folhas grandes e totalmente abertas da planta; tal condição, em todas as passifloráceas, só é cumprida nas folhas mais maduras do ramo (Elpino-Campos 2010, Rodrigues e Moreira 1999). Fêmeas de *Heliconius erato*, por outro lado, colocam um ovo por vez, em gavinhas e folhas jovens que ainda podem estar fechadas, e que são

pequenas e mais tenras (Mugrabi-Oliveira e Moreira 1996b). Larvas jovens, de hábito solitário, sofrem mortalidade elevada quando obrigadas a se alimentar de folhas maduras (Rodrigues e Moreira 1999) o que Silveira (2002) e Elpino-Campos (2010) associaram à fratura das mandíbulas desses indivíduos, devido principalmente à incapacidade morfológica das mesmas para consumir o tecido vegetal duro característico de folhas velhas.

Transições de um comportamento gregário ao comportamento solitário são comuns em larvas de Lepidoptera (Fitzgerald 1993), e podem indicar mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento para o balanço entre custos e benefícios de vida em grupo (Stamp 1981), já mencionados anteriormente, ou a presença de restrições ontogenéticas tais como aqueles relacionados ao tamanho do corpo impedindo a vida gregária em instares avançados (Hochuli 2001). Sugerimos que a condição gregária de *L. doris* capacita às mandíbulas cortadoras de larvas jovens, por facilitação alimentar, a se alimentar de folhas mais maduras (duras) possivelmente escolhidas pela fêmea por serem maiores e garantir alimento e suporte mecânico suficiente para todas as larvas. Posteriormente, e de acordo com nossas observações, após atingir o quarto instar, quando a condição gregária é dissolvida, se dá a transição de uma mandíbula cortadora de instares iniciais para a mandíbula raspadora observada nesses indivíduos no fim do desenvolvimento, e que capacitam as larvas para se alimentar sozinhas de folhas duras.

#### **4.2. Efeitos da idade da folha consumida nas estruturas alimentares dos**

##### **Heliconiini.**

No que se refere ao hábito alimentar idade da folha consumida pelos indivíduos, foi determinado que o músculo adutor mandibular de larvas de quinto instar de *H. erato*

criadas em folhas velhas são maiores do que aquelas criadas em folhas jovens, como exposto por alguns autores que sugerem que a dureza do alimento determina o tamanho dos músculos associados às mandíbulas (Dass 1937, Bernays 1991). Por outro lado, aumentos significativos no tamanho da cabeça e mandíbulas a razão da alimentação com folhas velhas não foram evidenciados. No que se refere às taxas de crescimento dos músculos adutores com relação às mandíbulas, os músculos mostraram uma tendência a crescer proporcionalmente menos do que as mandíbulas em ambos os tratamentos, o que não corrobora as relações de crescimento da cabeça em relação com o tamanho do corpo encontrados por Bernays (1986) em larvas de mariposas alimentadas com diferentes dietas.

Bernays (1986) em estudo com larvas de *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentados com plantas do gênero *Zea*, *Bambusa* e *Cynodon*, consideradas rígidas, exibiram cabeças proporcionalmente maiores em relação com o tamanho do corpo do que larvas alimentadas com uma dieta artificial, extremamente macia. A autora atribuiu a músculos adutores mandibulares maiores alojados nas cabeças nos primeiros indivíduos, que lhes permitiu lidar mais facilmente com tecidos duros. Esta discrepância com nossos resultados pode estar relacionada com a alta suscetibilidade de larvas jovens de *H. erato* quando expostas ao consumo obrigatório de folhas velhas, que é devastador em termos de sobrevivência quando comparada com a condição alimentar natural, em folhas jovens (Rodrigues e Moreira 1999) o que praticamente inabilita a espécie para o consumo de folhas maduras nos instares iniciais. Nesse sentido, e levando em conta que poucos indivíduos de instares iniciais sobrevivem à alimentação com tecidos rígidos, sugerimos que repercussões associadas com alterações das partes esclerotinizadas do aparelho mandibular (cabeça e mandíbulas) nesses indivíduos aconteceriam em instares

iniciais (mais vulneráveis) e estariam dissolvidas, após a muda, em indivíduos de instares posteriores, analisados nesse estudo, e por isso não foram estatisticamente evidenciadas. Nesse sentido, também não foi possível verificar mudanças de forma nas mandíbulas das larvas de quinto instar criadas durante toda a ontogênese com folhas jovens quando comparadas com as alimentadas com folhas maduras do hospedeiro. Independentemente da idade de folha consumida, as mandíbulas nessa espécie apresentaram-se fortemente dentadas e de tipo cortador desde início ao fim do desenvolvimento larval de acordo com o descrito por Millan et al. (2016). Evidentemente isto tem a ver com a conduta natural da espécie que, à medida que avança o desenvolvimento, torna os indivíduos capazes para consumir tecidos rígidos, e lhes permite manter a condição cortadora das suas mandíbulas até o fim do desenvolvimento (Millan et al. 2016).

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.**

Custos adicionais em larvas de *D. juno* criadas em densidades baixas estiveram associados a indivíduos com cabeças e mandíbulas maiores, o que relacionamos com a necessidade de lidar sozinhas com tecidos duros do hospedeiro, enquanto larvas criadas em grupos maiores conseguiram contornar essa barreira, por facilitação alimentar, que presumivelmente incluiria processos de amolecimento/fragmentação dos tecidos por meio de pré-mastigação em grupo, o que resta a ser testado.

A forma das mandíbulas em larvas de quinto instar de ambas as espécies foi diferente dependendo do nível de agregação sofrido pelas larvas durante o desenvolvimento, indicando que existe uma plasticidade fenotípica mandibular relacionada com a capacidade de consumo de tecidos duros, que mostra que larvas

alimentadas com esse tipo de tecido, quando criadas sozinhas, exibem aparelhos bucais dentados e que quando criadas em conjunto, mandíbulas com dentes evidentemente aplanados são induzidas.

No que se refere ao hábito alimentar da idade da folha consumida, demonstramos que larvas de quinto instar que consomem folhas maduras desde o início do desenvolvimento precisam investir no fortalecimento dos músculos mandibulares para conseguir acessar o alimento rígido, o que não acarretou mudanças no tamanho das suas cabeça e mandíbulas. Possivelmente, isso se deve a que pressões exercidas sobre estruturas esclerosadas, como cabeça e mandíbulas, estariam sendo exercidas em larvas jovens, onde a alimentação em tecidos duros é prejudicial, e portanto, os efeitos estariam dissolvidos após sofrerem as mudas correspondentes até o quinto instar, estudado nesse trabalho, e que naturalmente, como é reconhecido para a espécie, torna às larvas capazes de consumir material vegetal duro até o empupamento. Nesse sentido, estudos complementares que realizem comparações alométricas entre o crescimento da cabeça e mandíbulas de larvas jovens submetidas a criações em folhas jovens e maduras devem ser conduzidos.

## **6. AGRADECIMENTOS**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado concedida para a realização desse estudo. Aos revisores do artigo pelas suas sugestões para o melhoramento do mesmo.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Alexander, A.J., 1961. A study of the biology and behavior of the Caterpillars, Pupae and Emerging Butterflies of the Subfamily Heliconiinae in Trinidad, West Indies. Part I. Some Aspects of larval Behavior. *Zoologica* 46, 1-24.
- Adams, D.C., Rosenberg M.S., 1998. Partial warps, phylogeny, and ontogeny: a comment on Fink and Zelditch (1995). *Systematic Biology* 47, 168–173.
- Atkison, J.W., 1992. Conceptual issues in the reunion of development and evolution. *Synthese*, Dordrecht 91, 93-110.
- Aymone, A.C., 2006. Alometria cefálica na ontogênese de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 37p.
- Aymone, A.C., 2009. Restrições ontogenéticas na evolução da forma da cápsula cefálica em oito espécies de heliconíneos (Lepidoptera: Nymphalidae). Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 107p.
- Beldade, P., Koops, K. and Brakefield, P.M., 2002. Development constraints versus flexibility in morphological evolution. *Nature*, London 416, 844-847.
- Beltrán, M., Jiggins, C.D., Brower, A.V.Z., Bermingham, E. and 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, W.W., Brown, K.S. Jr. and Gilbert, L.E., 1976. Coevolution of plants and herbivores: passion flowers butterflies. *Evolution* 29, 659-680.
- Bernays, E. A., 1986. Diet-Induced head allometry among Foliage-Chewing insects and its importance for graminivores. *Science* 231 (4737), 495-497.

- Bernays, E. A., 1991. Evolution of insect morphology in relation to plants.-  
Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences 333, 257-264.
- Benrey, B. and Denno, R. F., 1997. The slow-growth-highmortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. – Ecology 78, 987–999.
- Bianchi, V. and Moreira, G.R.P., 2005. Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* (Lepidoptera: Nymphalidae). Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, 22, 43-50.
- Brakefield, P.M., 2006. Evo-devo and constraints on selection. Trends in Ecology and Evolution, Amsterdam 21, 362-368.
- Brown, Jr., Mielke, O.H.H., 1972. The heliconias of brazil (lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe. Zoologica, New York 57, 1-40.
- Brown, Jr., 1981. The biology of Heliconius and related genera. Annual review of Entomology, Stanford 26, 427-456.
- Cervi, A.C., 1997. Passifloraceae do Brasil: estudo do genero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. FontQueria 45, 1-92.
- Constantino, L.M., Gil, Z.M. and Corredor, G., 2005. Chromatic polymorphism of *Laparus doris obscurus* and determination of the phenotypic frequency through intraspecific crosses of three populations in the departments of Valle and Caldas, Colombia (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconinae). Boletin Cientifico Museo Historia Natural, Universidad de Caldas 9(1), 222-237.
- Damman, H., 1991. Oviposition behaviour and clutch size in a group feeding pyralid moth, *Omphalocera munroei*. Journal Animal Ecology 60, 193–204.

- Dass, G.M., 1937. The musculature of the mouth-parts of insect larvae. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 80, 39-80.
- Elpino-Campos, A., 2010. Características da planta hospedeira, ontogênese e comportamento alimentar de larvas de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1975) (Lepidoptera: Nymphalidae). Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 122p.
- Feuillet, C. and MacDougal, J.M., 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* 13, 34-38.
- Fitzgerald, T.D., 1993. Sociality in caterpillars. *Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging* (ed. By N. E. Stamp and T. M. Casey), Chapman & Hall, London, 372–404.
- Futuyma, D.J., 2000. Some current approaches to the evolution of plant–herbivore interactions. *Plant Species Biology* 15, 1-9.
- Ghent, A. W., 1960. A study of group feeding behaviour of larvae of the jack pine sawfly, *Neodiprion pratti banksianae* Roh. *Behaviour* 16, 110–148.
- Gilbert, L.E., 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, 210-240p.
- Gilbert, L.E., 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, 403-427p.
- Hall, B.K., Pearson, R., Muller, G.B., 2003. *Environment, Evolution and Development: Toward a Synthesis*. Cambridge Press, 304p.

- Hochberg, M. E., 1991. Viruses as costs to gregarious feeding behaviour in the Lepidoptera. *Oikos* 61, 291–296.
- Hochuli, D., 2001. Insect herbivory and ontogeny: how do growth and development influence feeding behaviour, morphology, and host use? *Austral Ecology* 26, 563–570.
- Hunter, A. F., 2000. Gregariousness and Repellent Defences in the Survival of Phytophagous Insects”. *Oikos* 91 (2), 213–24.
- Killip, E.P., 1938. The American Species of Passifloraceae. Museum of Natural History, Botanical Series, New York, 613p.
- Le Masurier, A. D., 1994. Costs and benefits of egg clustering in *Pieris brassicae*. – *J. Anim. Ecol.* 63, 677–685.
- Millan, C., Borges, S. S., Rodrigues, D. and Moreira, G.R.P. 2013. Behavioral and life-history evidence for interspecific competition in the larvae of two heliconian butterflies. *Naturwissenschaften* 100(10), 901-911.
- Milward-de-Azevedo, M. A. and Baumgratz J. F. A., 2004. *Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste Do Brasil. *Rodriguésia* 55 (85), 17–54.
- Mondin, C.A., 2001. *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação de ocorrência para o Rio Grande do Sul. *Pesquisas-Botânica* 51, 147-150.
- Mondin, C.A., Cervi, A.C. and Moreira, G.R.P., 2011. Sinopses das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 9, 7-29.

- Mugrabi-Oliveira, E. and Moreira, G.R.P., 1996. 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.
- Nijhout, H.F., 2008. Development phenotypic landscapes. *Evolutionary biology*, New York 35, 100-103.
- Petersen, S. C., 1987. Communication of leaf suitability by gregarious eastern tent caterpillars (*Malacosoma americanum*). *Ecological Entomology* 12, 283–289.
- Rodrigues, D. and Moreira, G.R.P., 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.
- Reader, T. and Hochuli, D. F., 2003), Understanding gregariousness in a larval Lepidopteran: the roles of host plant, predation and microclimate. *Ecological Entomology* 28, 729–737.
- Rohlf, F. J., 2006. A comment on "phylogenetic correction". *Evolution* 60, 1509-1515.
- Ulmer, Y. and MacDougal, J.M., 2004. *Passiflora: Passionflowers of the world*. Portland, Oregon, 430p.
- Sacco, J.C., 1980. Passifloráceas. In: Reitz R (eds). *Flora ilustrada catarinense*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajai, 130p.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 9, 945–967.
- Schultz, J. C., 1983. Habitat selection and foraging tactics of caterpillars in heterogeneous trees. In: Denno, R. F. and McClure, M. S. (eds), *Variable plants and herbivores in natural and managed systems*. Academic Press, 61–90p.
- Seymour, R. S., 1974. Convective and evaporative cooling in sawfly larvae. – *Journal Insect Physiology* 20, 2447–2457.

Silveira, M.A.P.A., 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.

Smith, K.K., 2003. Time's Arrow: Heterochrony and the evolution of development. *International Journal of developmental Biology*, Leioa 47, 613-621.

Stamp, N.E., 1981. Effect of group size on parasitism in a natural population of the Baltimore checkerspot (*Euphydryas phaeton*). *Oecologia* 49, 201–206.

**Tabela 1.** Comparações entre o tamanho da cabeça e tamanho da mandíbula de lagartas de quinto instar de *Dione juno* criadas em *Passiflora edulis*. Asterisco indica significância estatística (alfa = 0.05).

Densidade larval (N)	<i>p</i> (testes de Dunn)		
	4	8	16
<b>Tamanho da cabeça (mm)</b>			
Kruskal-Wallis= 24.79			
p<0.001*			
4	-	0.05827	0.0005072*
8	-	-	0.0000775*
16	-	-	-
<b>Tamanho da mandíbula (centroide)</b>			
Kruskal-Wallis= 11.65			
p=0.00295*			
4	-	0.08495	0.2024
8	-	-	0.000413*
16	-	-	-

**Tabela 2.** Comparações alométricas (ANCOVAs) entre as inclinações e interceptos das retas correspondentes ao crescimento do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular (centroide) de larvas de quinto instar de duas espécies de heliconíneos criados em diferentes densidades. Asterisco indica significância estatística

Espécie	Densidade larval (N)	$\beta$		$\alpha$	
		F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
<i>Dione juno</i>	4	7.05914	0.01074*	-	-
	8	0.75078	0.39050	2821.5	<0.0001*
	16	75.7817	<0.0001*	-	-
<i>Laparus doris</i>	4	0.03920	0.8444	574.537	<0.0001*
	8	0.04085	0.8411	662.311	<0.0001*
	16	4.4951	0.0412*	-	-

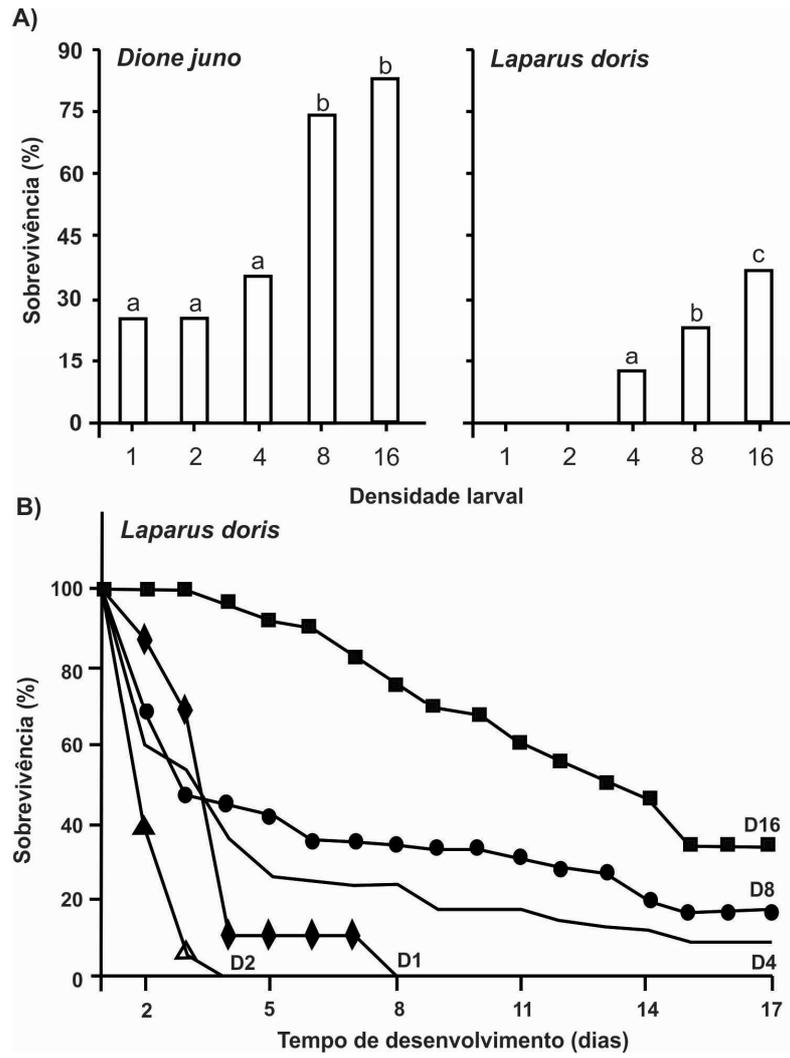
(alfa = 0.05)

**Tabela 3.** Comparações entre o tamanho da cabeça, tamanho da mandíbula e área do músculo adutor mandibular de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas com folhas jovens e maduras de *Passiflora suberosa*. Asterisco indica diferença estatística significativa.

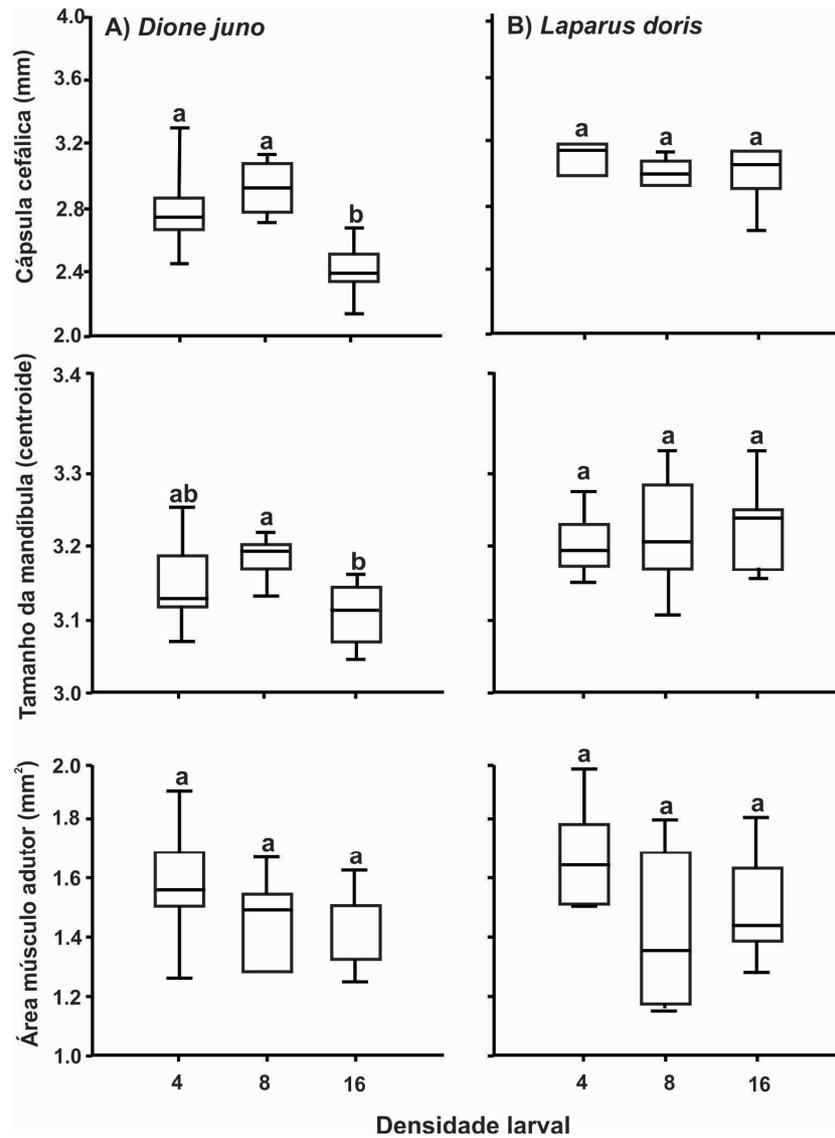
<b>Parâmetro</b>	<b>Mann Whitney U</b>	<b><i>p</i></b>
Tamanho da cabeça (mm)	52.00	0.4576
Tamanho da mandíbula (centroide)	42.00	0.2069
Área do músculo adutor (mm <sup>2</sup> )	13.00	0.0020*

**Tabela 4.** Comparações alométricas (ANCOVAs) das inclinações e interceptos correspondentes às retas de crescimento do músculo adutor mandibular vs. tamanho mandibular (centroide) de larvas de quinto instar de *H. erato* criadas em folhas de duas idades de *P. suberosa*. Asterisco indica significância estatística (alfa = 0.05).

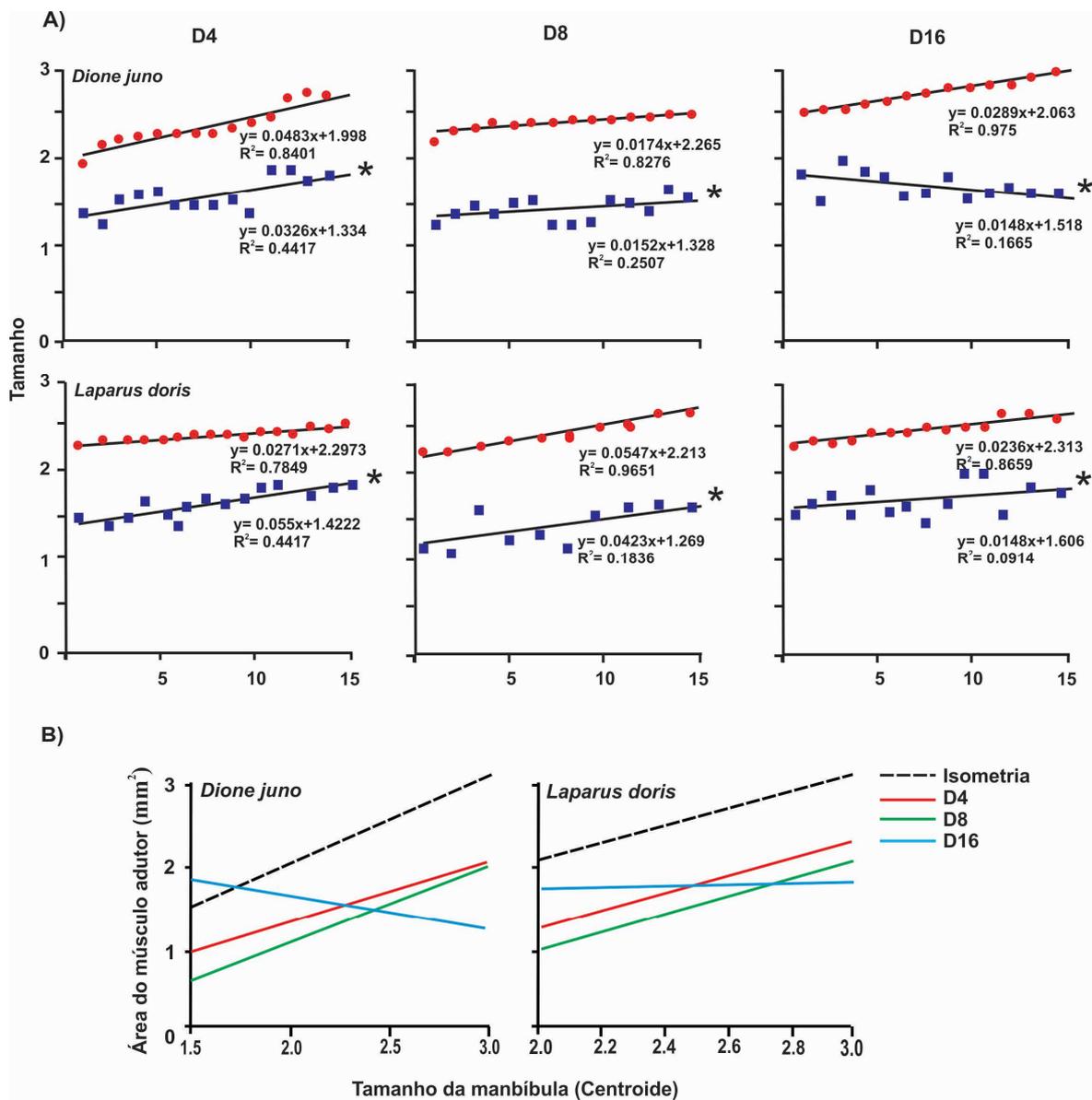
Idade de folha de <i>Passiflora</i>	$\beta$		$\alpha$	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
<b>Jovem</b>	5.25624	0.03021*	-	-
<b>Velha</b>	7.80903	0.00915*	-	-



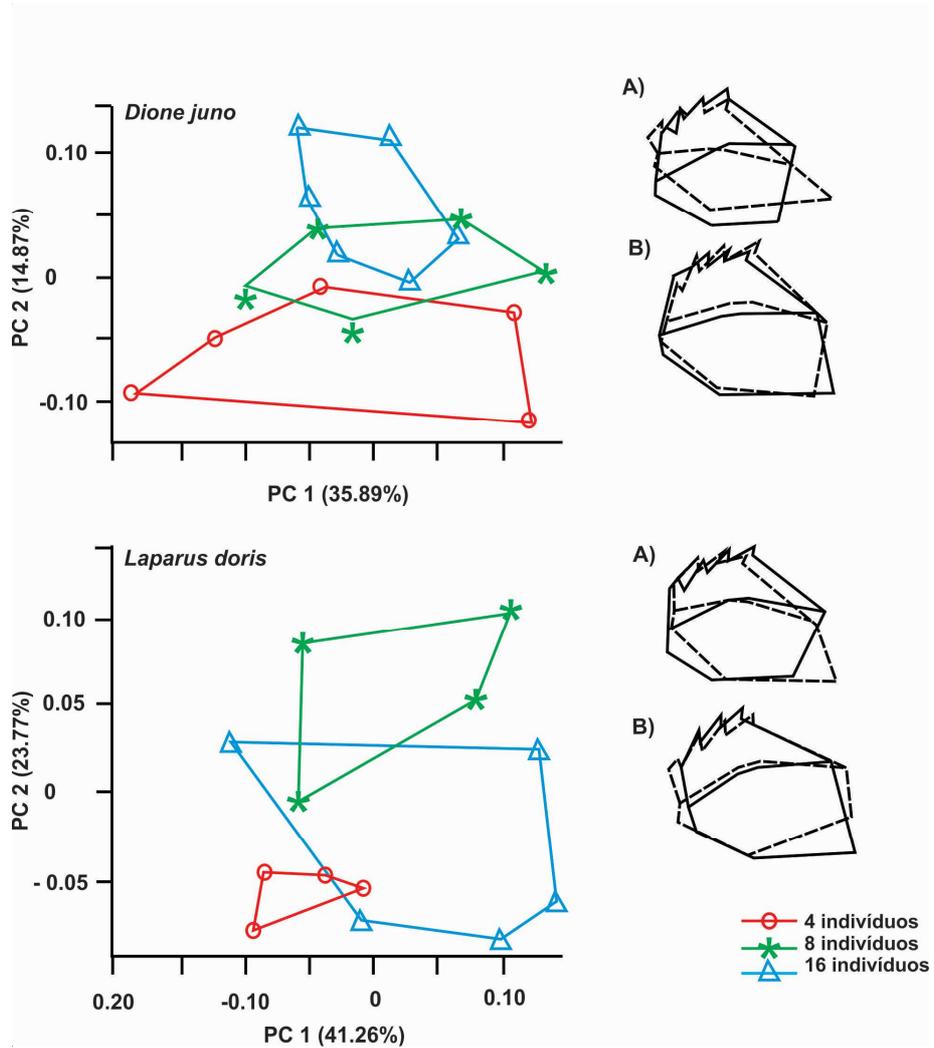
**Fig. 1**  
Millan et al. 90mm



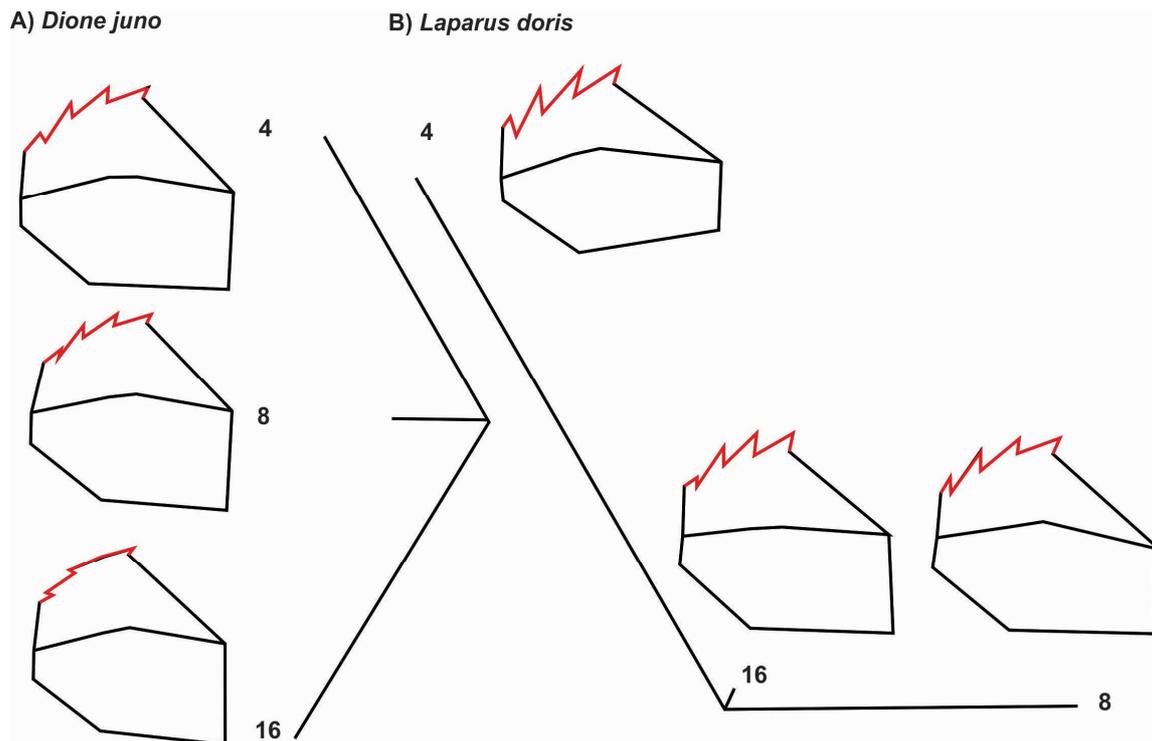
**Fig. 2**  
**Millan et al. 140mm**



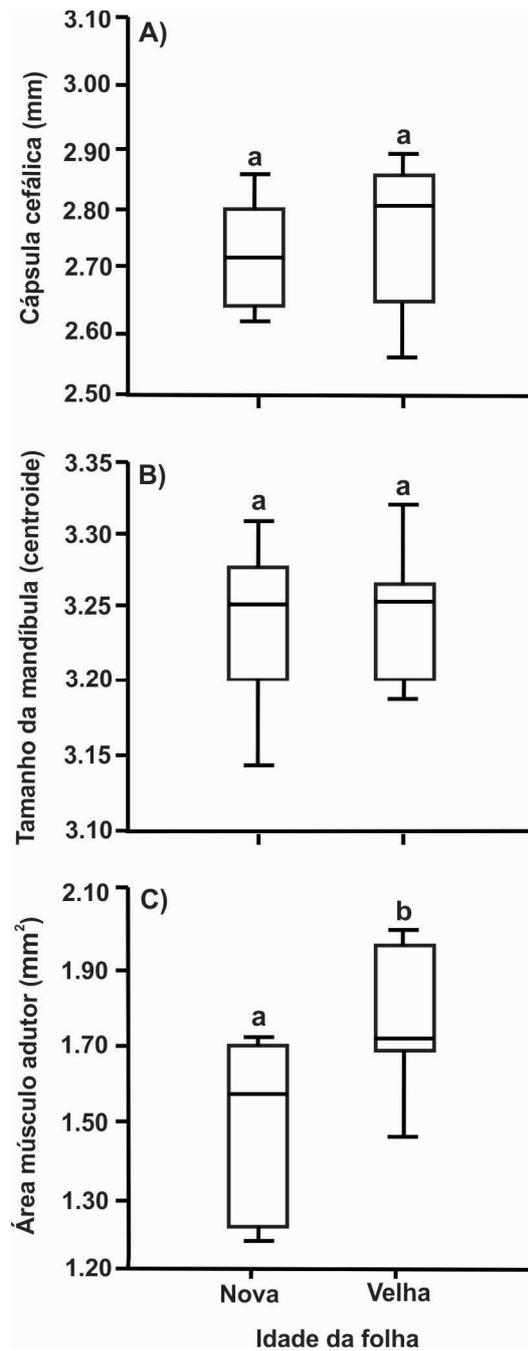
**Fig. 3**  
Millan et al. 140mm



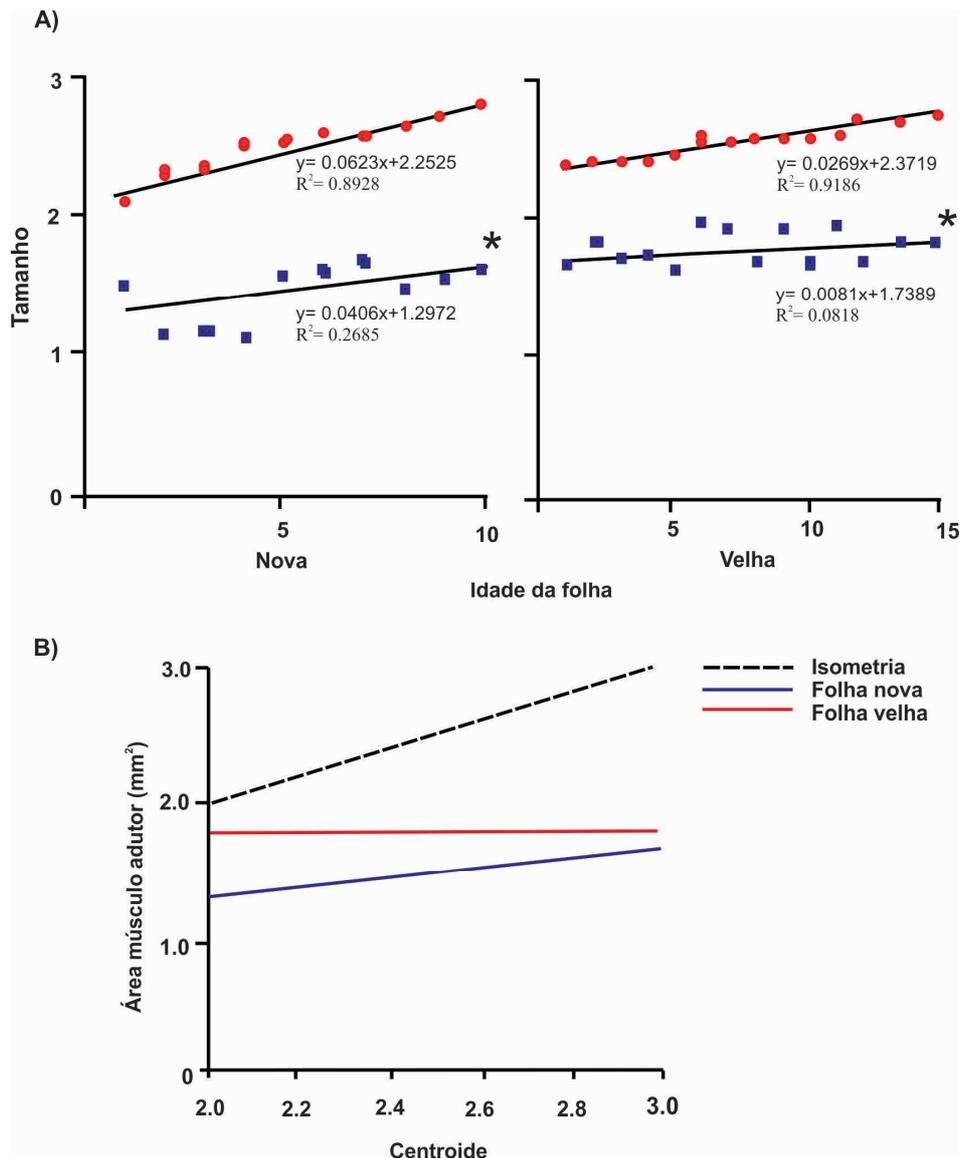
**Fig. 4**  
**Millan et al. 140mm**



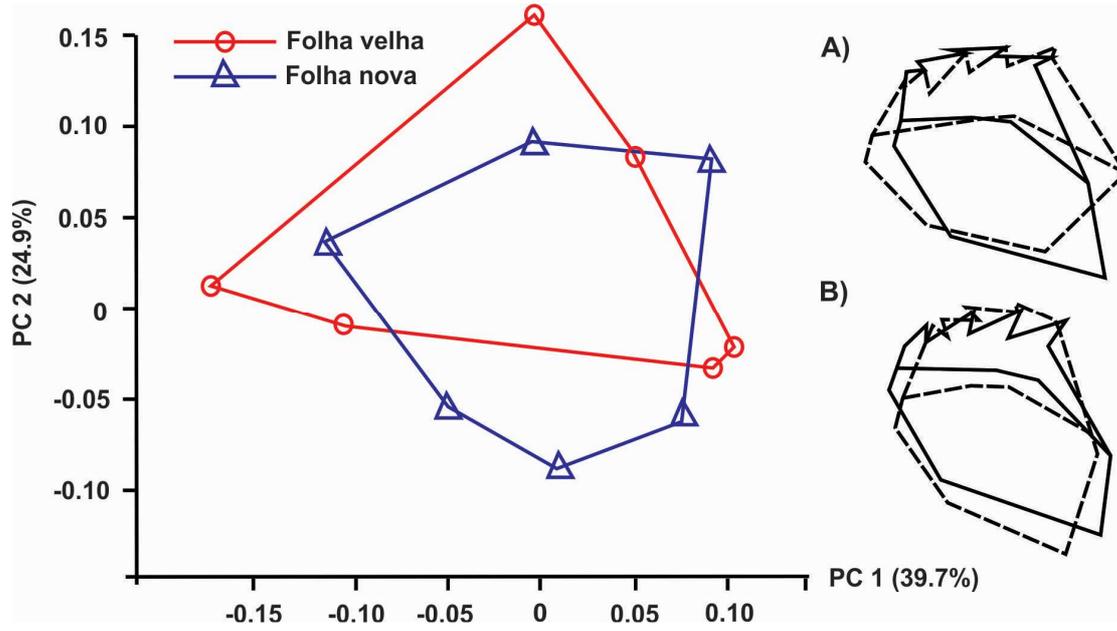
**Fig. 5**  
**Millan et al. 140mm**



**Fig. 6**  
Millan et al. 90mm



**Fig. 7**  
**Millan et al. 140mm**



**Fig. 8**  
**Millan et al. 140mm**

## Lista de tabelas

**Tabela 1.** Comparações entre o tamanho da cabeça e tamanho da mandíbula de lagartas de quinto instar de *Dione juno* criadas em *Passiflora edulis*. Asterisco indica significância estatística (alfa = 0.05).

**Tabela 2.** Comparações alométricas (ANCOVAs) entre as inclinações e interceptos das retas correspondentes ao crescimento do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular (centroide) de larvas de quinto instar de duas espécies de heliconíneos criados em diferentes densidades. Asterisco indica significância estatística (alfa = 0.05).

**Tabela 3.** Comparações entre o tamanho da cabeça, tamanho da mandíbula e área do músculo adutor mandibular de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas com folhas jovens e maduras de *Passiflora suberosa*. Asterisco indica diferença estatística significativa.

**Tabela 4.** Comparações alométricas (ANCOVAs) das inclinações e interceptos correspondentes às retas de crescimento do músculo adutor mandibular vs. tamanho mandibular (centroide) de larvas de quinto instar de *H. erato* criadas em folhas de duas idades de *P. suberosa*. Asterisco indica significância estatística (alfa = 0.05).

## Lista de figuras

**Figura 1. A)** Sobrevivência de indivíduos de *Dione juno* (Extraído de Bianchi e Moreira 2005) e *Laparus doris* criadas até a emergência dos adultos em cinco diferentes densidades e **B)** Curvas de sobrevivência de larvas de *L. doris* criadas em cinco diferentes densidades. Box plots com letras diferentes indicam diferença estatística significativa (Testes Qui-quadrado,  $p < 0.0001$ ) e as abreviações D1, D2, D4, D8 e D16 correspondem às criações em densidades de 1, 2, 4, 8 e 16 indivíduos, respectivamente.

**Figura 2.** Tamanho da cápsula cefálica (acima), mandíbula (meio) e área do músculo adutor mandibular (abaixo) de lagartas de quinto instar de *Dione juno* (coluna A) e *Laparus doris* (coluna B) criadas em três diferentes densidades. Box plots com letras diferentes diferem estatisticamente (teste de Kruskal-Wallis, seguido de testes de Dunn,  $p < 0.05$ ).

**Figura 3. A)** Retas de crescimento do centroide mandibular (círculos vermelhos preenchidos) e área do músculo adutor da mandíbula (quadrados azuis preenchidos) de lagartas de quinto instar de duas espécies de heliconíneos criadas em *P. edulis* e *P. maliformis* e a **B)** Variação da área do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular dos indivíduos; D4, D8 e D16 indicam a densidades larvais de 4, 8 e 16 indivíduos, respectivamente. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as inclinações e/ou interceptos das retas correspondentes (ANCOVAs,  $p < 0.05$ ).

**Figura 4.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares de lagartas de quinto instar de *Dione juno* (acima) e *Laparus doris* (abaixo) criadas em densidades de 4, 8 e 16 indivíduos. **A)** e **B)** representam as deformações obtidas por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2),

respectivamente. Para ambas as espécies, há diferenças significativas dentre as formas mandibulares dos indivíduos criados nas diferentes densidades (MANOVAs,  $p < 0.05$ ).

**Figura 5.** Árvores Neighbor-Joining (não enraizadas) das distâncias fenotípicas de Mahalabonis das formas mandibulares de larvas de quinto instar de A) *Dione juno* e B) *Laparus doris* criadas em três diferentes densidades (4, 8 e 16 indivíduos). As ilustrações mandibulares associadas a cada densidade correspondem à forma média obtida por sobreposição de Procrustes (GPA) dos indivíduos de cada espécie, segundo o nível de agregação larval. Os ápices observados na parte mais externa da área incisora, ressaltados em vermelho, correspondem às bases dos dentes mandibulares sendo que as pontas destes estão localizadas na parte interna, e se curvam em direção à área molar no quinto instar dos heliconíneos.

**Figura 6.** Tamanho da A) cápsula cefálica, B) mandíbula e C) músculo adutor mandibular de lagartas de quinto instar de *H. erato* alimentadas com duas idades de folha de *Passiflora suberosa*. Box plots com letras diferentes diferem estatisticamente (Teste de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

**Figura 7.** A) Retas de crescimento do centroide mandibular (círculos vermelhos preenchidos) e área do músculo adutor da mandíbula (quadrados azuis preenchidos) de lagartas de quinto instar de *H. erato* criadas duas idades de *Passiflora suberosa* e a B) Variação da área do músculo adutor mandibular em relação ao tamanho mandibular dos indivíduos. Asteriscos indicam diferenças significativas entre as inclinações das retas correspondentes (ANCOVAs,  $p < 0.05$ ).

**Figura 8.** Análise de Componentes Principais (PCA) das formas mandibulares de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* criadas em duas idades de folhas de *Passiflora suberosa*. A) e B) representam as deformações obtidas por “Thin Plate Splines” do componente principal 1 (PC1) e componente principal 2 (PC2), respectivamente. Não há diferenças dentre as formas mandibulares dos indivíduos criados em folhas jovens e maduras do hospedeiro (MANOVAs,  $p > 0.05$ ).

## CONCLUSÕES

Demonstramos o crescimento diferenciado da mandíbula em relação com a cápsula cefálica em representantes das principais linhagens de lepidópteros heliconíneos e a ocorrência de mudanças de forma na mandíbula durante a ontogênese das espécies. Adicionalmente, evidenciamos convergências de forma mandibular entre espécies filogeneticamente afastadas como resposta a tipos de hábitos alimentares compartilhados (idade da folha consumida ou alimentação em grupo), correspondendo principalmente à necessidade primária de sobrevivência larval.

A forma mandibular de lagartas de quinto instar de *Heliconius erato* exibiram formas diferenciadas dependendo da espécie de *Passiflora* consumida pelas mesmas; ditas mudanças estiveram associadas aos dentes incisores, mais pronunciados em indivíduos criados em *P. suberosa*, o hospedeiro com folhas mais duras e espessas. Características da espécie hospedeira utilizada pelas lagartas, tais como espessura do limbo foliar e dureza da folha, modificam a forma das mandíbulas dos indivíduos como resposta a plasticidade fenotípica induzida para acessar ao recurso mais eficientemente.

A mandíbula, independentemente da planta hospedeira utilizada pelas larvas de *H. erato*, cresceu proporcionalmente mais do que o músculo adutor, que mostrou ser um caráter mais conservado (estável).

Custos adicionais em larvas de *D. juno* criadas em densidades baixas estiveram associados a indivíduos com cabeças e mandíbulas maiores, o que relacionamos com a necessidade de lidar solitariamente com tecidos duros do hospedeiro, enquanto larvas criadas em grupos maiores conseguiram contornar essa barreira, por facilitação alimentar, que presumivelmente incluiria processos de amolecimento/fragmentação dos tecidos por meio de pré-mastigação em grupo, o que resta a ser testado.

A forma das mandíbulas em larvas de quinto instar de ambas as espécies foi diferente dependendo do nível de agregação sofrido pelas larvas durante o desenvolvimento, indicando que existe uma plasticidade fenotípica mandibular relacionada com a capacidade de consumo de tecidos duros, que mostra que larvas alimentadas com esse tipo de tecido, quando criadas sozinhas, exibem aparelhos bucais com dentes pontiagudos e que quando criadas em conjunto, mandíbulas com dentes evidentemente menos pronunciados são induzidas.

No que se refere ao hábito alimentar da idade da folha consumida e gregariedade, demonstramos que larvas de quinto instar que consomem folhas maduras desde o início do desenvolvimento precisam investir no fortalecimento dos músculos mandibulares para conseguir acessar o alimento rígido, o que não acarretou mudanças no tamanho das suas cabeça e mandíbulas. Possivelmente, isso se deva a que pressões exercidas sobre estruturas esclerotinizadas, como cabeça e mandíbulas, estariam sendo exercidas em larvas jovens, onde a alimentação em tecidos duros é prejudicial, e portanto, os efeitos estariam diluídos após sofrerem as mudas correspondentes até o quinto instar, estudado nesse trabalho.

Futuramente estudos complementares que contemplem comparações alométricas entre o crescimento da cabeça e mandíbulas de larvas jovens submetidas a criações em folhas jovens e maduras devem ser conduzidos, com o fim de estabelecer se ditas larvas estariam sofrendo (ou não) pressões alométricas nas estruturas alimentares causadas pela dureza do alimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, A.J., 1961. A study of the biology and behavior of the Caterpillars, Pupae and Emerging Butterflies of the Subfamily Heliconiinae in Trinidad, West Indies. Part I. Some Aspects of larval Behavior. *Zoologica* 46, 1-24.
- Aymone, A.C., 2006. Alometria cefálica na ontogênese de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 37p.
- Aymone, A.C., 2009. Restrições ontogenéticas na evolução da forma da cápsula cefálica em oito espécies de heliconíneos (Lepidoptera: Nymphalidae). Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 107p.
- Baines, R.A., Tyrer, N.M., Downer, R.G.H., 1990. Serotonergic innervation of the locust mandibular closer muscle modulates contractions through the elevation of cyclic adenosine monophosphate. *Journal of Comparative Neurology*, Philadelphia, 294, 623-632.
- Atkison, J.W., 1992. Conceptual issues in the reunion of development and evolution. *Synthese*, Dordrecht, 91, 93-110.
- Beldade, P., Koops, K., Brakefield, P.M., 2002. Development constraints versus flexibility in morphological evolution. *Nature*, London, 416, 844-847.
- Beltrán, M., Jiggins, C.D., Brower, A.V.Z., Bermingham, E., Mallet, J., 2007. Do pollen feeding, pupal-matting and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius* butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society*, London, 92, 221-239.

- Benson, W.W., Brown, K.S. Jr., Gilbert, L.E., 1976. Coevolution of plants and herbivores: passion flowers butterflies. *Evolution* 29, 659-680.
- Bernays, E.A., 1986. Diet-Induced head allometry among Foliage-Chewing insects and its importance for graminivores. *Science* 231 (4737), 495-497.
- Bernays, A., Jarzembowski, E.A., Malcom, S.B., 1991. Evolution of insect Morphology in Relation to plants (and discussion). *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 333, 257-264.
- Bernays, E.A., 1998. Evolution of feeding behavior in insect herbivores. *BioScience* 48, 35-44.
- Bernays, E.A., 2001. Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review Entomology* 46, 703-727.
- Bianchi, V., Moreira, G.R.P., 2005. Preferência alimentar, efeito da planta hospedeira e densidade larval na sobrevivência e desenvolvimento de *Dione juno juno* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, 22, 43-50.
- Bookstein, F.L., 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, New York, 435p.
- Bookstein, F.L., 1996. *Biometrics*, biomathematics, and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology* 58, 313-365.
- Brakefield, P.M., 2006. Evo-devo and constraints on selection. *Trends in Ecology and Evolution*, Amsterdam, 21, 362-368.
- Brown, Jr., Mielke, O.H.H., 1972. The heliconias of Brazil (lepidoptera: Nymphalidae). Part II. Introduction and general comments, with a supplementary revision of the tribe. *Zoologica*, New York, 57, 1-40.
- Brown, Jr., 1981. The biology of *Heliconius* and related genera. *Annual review of Entomology*, Stanford, 26, 427-456.

- Cervi, A.C., 1997. Passifloraceae do Brasil: estudo do genero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. FontQuerria 45, 1-92.
- Chapman, R.F., 1964. The structure and wear of mandibles in some African grasshoppers. Proceedings of the Zoological Society of London 142 (1), 107-121.
- Chapman, R.F., 1998. The insects: structure and function. Harvard Univesity Press, Cambridge, 919p.
- Cheverud, J.M., 1982. *Relationships among* ontogenetic, static, and evolutionary allometry. American Journal of Physical Anthropology, 59, 139-149.
- Frankino, W.A., Zwaan, B.J., Stern, D.L., Brakefield, P.M., 2007. Internal and external constraints in the evolution of morphological allometries in a butterfly. Evolution 61, 2958-2970.
- Gayon, J., 2000. History of concepts allometry. American Zoology, New York, 40, 748-758.
- Dass, G.M., 1937. The musculature of the mouth-parts of insect larvae. Quartely Journal of Microscopical Science, London, 80, 39-80.
- Dell'errba, R., Kaminski, L.A., Moreira, G.R.P., 2005. O estágio de ovo dos Heliconiini (Lepidoptera, Nymphalidae) do Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, Série Zoologia 95, 29-46.
- Elpino-Campos, A., 2010. Características da planta hospedeira, ontogênese e comportamento alimentar de larvas de *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1975) (Lepidoptera: Nymphalidae). Dissertação de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade Federal do Rio grande do Sul. 122p.
- Elpino-Campos, A., 2011. Feeding behavior of *Heliconius erato phyllis* (Fabricius) (Lepidoptera: Nymphalidae) larvae on passion vines. Acta Ethologica, 1-12.

- Emlen, D.J., 1996. Artificial selection on horn length-body size allometry in the horned beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Evolution* 50, 1219–1230.
- Emlen, D.J., 1997. Diet alters male horn allometry in the beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceedings of the Royal Society of London*, 264, 567–574.
- Feuillet, C. and MacDougal, J.M., 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* 13, 34–38.
- Ferro, V.G., 1998. Criação de *Heliconius erato phyllis* (Fabricus) (Lepidoptera: Nymphalidae) em condições semi-naturais. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 49p.
- Futuyma, D.J., 2000. Some current approaches to the evolution of plant–herbivore interactions. *Plant Species Biology*, 15, 1–9.
- Gilbert, L.E., 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, L.E., 1991. Biodiversity of a central American *Heliconius* community: pattern, process, and problems. In: Price, P.W., Lewinsohn, T.M., Fernandes, G.W., Benson W.W. (eds). *Plant animal interactions: evolutionary ecology in tropical and temperate regions*. John Wiley & Sons, New York, pp 403–427.
- Gould, S.J., 1966. Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Reviews* 41, 587–640.
- Griss, C., 1990. Mandibular motor neurons of the caterpillar of the hawk moth *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Neurology*, Philadelphia, 296, 393–402.

- Hall B.K., Pearson, R., Muller, G.B., 2003. Environment, Evolution and Development: Toward a Synthesis. Cambridge MA, MIT Press, 304p.
- Huxley, J.S., 1950. Relative growth and form transformation. Proceedings of the Royal Society of London, London, 137, 465-469.
- Iseley, F.B., 1944. Correlation between mandibular morphology and food specificity in grasshoppers. Annals of the Entomological Society of America 37, 47-67
- Jorge, R.L., Cordeiro-Estrela, P., Klaczko, Moreira, G.R.P., Freitas, A.V.L., 2010. Host-plant dependent wing phenotypic variation in the Neotropical butterfly *Heliconius erato*. Biological Journal 102, 765-774.
- Kendall, D.G., 1977. The diffusion of shape. Advances in Applied Probability 9, 428-430.
- Killip, E.P., 1938. The American Species of Passifloraceae. Museum of Natural History, Botanical Series, New York, 613p.
- Klingenberg, C.P., Zimmermann, M., 1992. Static, ontogenetic, and evolutionary allometry: a multivariate comparison in nine species of water striders. The American Naturalist 140(4), 601-620.
- Masuko, K., 1986. Motor innervations and proprioceptors of the mouthparts in the worker honeybee *Apis mellifera*: I. Mandibular nerve. Journal of New York, 188, 51-68.
- Matsuda, R., 1965. Morphology and evolution of insect head. Memoirs of the American Entomological Institute, Annual Arbor Journal 4, 1-34.
- Millan, C., Silva, S.B., Rodrigues, D., Moreira, G., 2013. Behavioral and life-history evidence for interspecific competition in the larvae of two heliconian butterflies. Naturwissenschaften 100(10), 901-911.

- Monteiro, L.R., Abe, A.S., 1999. Functional and historical determinants of shape in the scapula of Xenarthran mammals: Evolution of a complex morphological structure. *Journal of Morphology* 241, 251–263.
- Monteiro, L.R., Reis, S.F., 1999. *Princípios de Morfometria Geométrica*. Editora Holos, Ribeirão Preto, 188p.
- Mugrabi-Oliveira, E., Moreira, G.R.P., 1996. 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.
- Muller, A.R., Wolf, S., Galler, S., Rathmayer, W., 1992. Correlation of electrophysiological; histochemical, and mechanical properties in fibre of the coxa rotator muscle of the *Lacusta migratoria*. *Journal of Comparative Physiology*, New York, 162, 5-15.
- Nijhout, H.F. 2008. Development phenotypic landscapes. *Evolutionary biology*, New York, 35, 100-103.
- Nijhout, H.F., Wheeler, D.E., 1996. Growth models of complex allometries in ants. *American Naturalist*, 148, 40-56.
- Nijhout, H.F., Emlen, D. J., 1998. Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Stanford 95, 3685-3689.
- Paul, J., Gronenberg, W., 1999. Optimizing force and velocity: Mandible muscle fibre attachments in ants. *The Journal of Experimental Biology* 202, 797–808.
- Paul, J., Gronenberg, W., 2002. Motor control of the mandible closer muscle in ants. *Journal of Insect Physiology*, Oxford, 48, 255-267.

- Penz, C.M., 1999. Higher level phylogeny for the passion-vine butterflies (Nymphalidae, Heliconiinae) based on early stage and adult morphology. *Zoological Journal of the Linnean Society*, London, 127, 277-344.
- Prieto, G.P., Munguira, M.L., Romo, H., 2009. Morphometric analysis of genitalia and wing pattern elements in the genus *Cupido* (Lepidoptera, Lycaenidae): are *Cupido minimus* and *C. carswelli* different species?. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 56(1), 137-147.
- Rehder, V., 1989. Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the subesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, Philadelphia, 279, 499-513.
- Rodrigues, D., Moreira, G.R.P., 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, G.R.P., 2005. Comparative description of the immature stages of two very similar leaf footed bugs, *Holymenia clavigera* (Herbst) and *Anisoscelis foliacea marginella* (Dallas) (Hemiptera, Coreidae, Anisoscelini). *Revista Brasileira de Entomologia* 49, 7-14.
- Rohlf, F.J., 1998. On application of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. *Systematic Biology* 47, 147-158.
- Roth, L., Mercer, J.M., 2000. *Morphometrics in Development and Evolution*. American Zoologist, New York, 40(5), 801-810.
- Scoble, M.J., 1992. *The Lepidoptera form, function and diversity*. Oxford University Press, New York, 404p.
- Silveira, M.A.P.A., 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.
- Smith, K.K., 2003. Time's Arrow: Heterochrony and the evolution of development. *International Journal of developmental Biology*, Leioa, 47, 613,621.
- Snodgrass, R.E., 1935. Principles of insect morphology. McGraw Hill Company, New York, 667p.
- Stern, D.L., Emlen, D.J., 1999. The developmental basis for allometry in insects. *Development* 126, 1091-1101.
- Ulmer, Y. and MacDougal, J.M., 2004. Passiflora: Passionflowers of de world. Portland, Oregon, 430p.
- Weihmann, T., Kleinteich, T., Gorb, S.N. and Wipfler, B., 2015. Functional morphology of the mandibular apparatus in the cockroach *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) – a model species for omnivore insects. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 73 (3), 477-488.
- Whitman, W.W., Ananthakrishnan, T.N., 2009. Phenotypic Plasticity of insects. Mechanisms and Consequences. Science Publishers, United States of America, 894p.
- Zelditch, M.L., Fink, W.L., 1995; Allometry and developmental integration of body growth in a piranha, *Pygocentrus nattereri* (Teleostei: Ostariophysi). *Journal of Morphology*, 223, 341-355.
- Zelditch, M.L., Fink, W.L., Swiderski, D.L., Lundrigan, B.L., 1998. On Applications of geometric morphometrics to studies on ontogeny and phylogeny: A reply to Rohlf. *Systematic Biology*, 47(1), 159-167.
- Zelditch, M.L., D. Swiderski, D. Sheets, Fink, W.L., 2004. Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. *Elsevier Academic Press*, New York and London, 43p.