

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Análise dos componentes comportamentais do cruzamento pupal na
borboleta *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae)**

Aluna: Mariana Pereira Giozza

Orientador: Aldo Mellender de Araújo

Trabalho apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel no Curso de
Ciências Biológicas (Ênfase Ambiental)

Porto Alegre, dezembro de 2011.

Redigido segundo as normas do periódico *Journal of Ethology* (em anexo), na versão em
português.

1 **Título:** Análise dos componentes comportamentais do cruzamento pupal na borboleta
2 *Heliconius erato phyllis* (Nymphalidae).

3

4

5

6 Mariana Pereira Giozza ^a e Aldo Mellender de Araújo ^a

7 ^a Laboratório de Genética Ecológica, Departamento de Genética, Instituto de Biociências,
8 Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

9

10

11 Correspondência (Aldo Mellender de Araújo):

12

13

14 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento
15 Gonçalves, 9500, Prédio 43323, sala 207. CEP: 91501-970. Cx. Postal 15053, Porto Alegre,
16 RS, Brasil. Fone +55 51 3308-6715 Fax +55 51 3316-7311. E-mail: aldo1806@gmail.com

17

18

19 E-mail Mariana Pereira Giozza: marygiozza@yahoo.com.br

20

21

22 Quantidade de palavras: 6.427

23

24

25

26 **Resumo**

27

28 *Heliconius erato phyllis* apresenta duas estratégias sexuais: a cópula precedida de
29 cortejo, onde a fêmea tem papel ativo na escolha do parceiro sexual; e o cruzamento pupal,
30 onde os machos visitam a pupa fêmea aguardando que esta emerja para a realização da cópula.
31 Esta estratégia pode ter surgido devido à monandria das fêmeas que, tornando-se receptivas
32 ainda em pupa, geram uma intensa competição entre machos nessa época do desenvolvimento,
33 seja por posição na pupa, ou pela cópula propriamente dita. Este trabalho analisa alguns
34 componentes do comportamento dos machos da borboleta *Heliconius erato phyllis*, entre eles:
35 inspeção e pouso sobre a pupa; mudança de estratégia sexual e se o tamanho da asa é um
36 preditor de sucesso. Em um viveiro foram feitas observações diárias de aproximadamente 30
37 minutos em pares de pupas sexadas previamente, até a eclosão; sendo uma de cada sexo, e na
38 presença de até 5 machos adultos. No total foram analisados 20 pares de pupas (n=40). As
39 médias de inspeção e pouso por dia para pupas macho foram, respectivamente, $22,1 \pm 28,2$ e
40 $2,1 \pm 3,0$ e para as pupas fêmeas foi de $33,5 \pm 30,2$ e $4,1 \pm 5,3$. As diferenças das médias não
41 foram estatisticamente significantes; no entanto, o valor total de inspeções e pousos
42 registrados foi significativamente maior em pupas fêmeas do que em pupas machos. Os dados
43 apontam ainda para outros aspectos que indicam que machos adultos reconhecem
44 preferencialmente pupas fêmeas. A não significância de alguns testes estatísticos pode estar
45 relacionada ao pequeno tamanho amostral; porém os padrões observados são similares ao
46 esperado devido ao conhecimento que se tem da fisiologia pupal (produção de feromônios
47 pelas fêmeas).

48

49 **Palavras chave:** Cruzamento pupal, seleção sexual, inspeção, pouso, borboleta,

50 *Heliconius*.

51 INTRODUÇÃO

52

53

54 *Heliconius erato phyllis* (Fabricius, 1775) é uma subespécie de borboleta pertencente à
55 família Nymphalidae, subfamília Heliconiinae. Essa subespécie de asas coloridas em preto,
56 vermelho e amarelo possui a maior distribuição geográfica da América do Sul dentro do
57 gênero *Heliconius*, ocorrendo desde o nordeste até o sul do Brasil, Bolívia, nordeste da
58 Argentina e Uruguai (Kaminski et al. 2002). Sua larva possui cinco estádios (*instars*), período
59 durante o qual a lagarta se alimenta de folhas jovens de espécies de maracujá como *Passiflora*
60 *misera* e *Passiflora suberosa*, utilizadas também como plantas hospedeiras para oviposição. O
61 indivíduo dessa espécie permanece no estágio pupal por aproximadamente dez dias, com uma
62 pequena variação dependente de umidade e irradiação solar. A pupa de *H. erato phyllis* possui
63 formato semelhante a uma folha seca, além de uma coloração parda que varia do bem claro até
64 o completamente melanizado (Ferreira et al. 2006). Os machos dessa espécie tornam-se
65 sexualmente ativos após cerca de 6 a 7 dias de vida adulta; ao contrário das fêmeas, que
66 próximo à sua emergência já podem copular, mesmo que os ovos produzidos nos ovários
67 ainda não estejam maduros. Entretanto, devido à transferência de um feromônio do macho
68 para a fêmea que faz com que ela seja ignorada por outros machos após o acasalamento
69 (Brower 1997), a fêmea copula somente uma vez na vida, ou seja, é monândrica. Essa
70 característica teria permitido a evolução de duas estratégias sexuais distintas na espécie: a
71 cópula precedida de cortejo e o cruzamento pupal.

72

73

74 A cópula precedida por cortejo é uma estratégia definida como procura ativa por
75 fêmeas, seguida de pouso e cortejo desta pelo macho (detalhes do processo de corte e de

76 possíveis conflitos de sinais reprodutivos em Klein & Araújo 2010), sendo que este faz
77 vistorias em sítios de oviposição e alimentação durante o dia, procurando por possíveis
78 parceiras sexuais. Estrada & Gilbert (2010) já afirmaram ser comum os machos do gênero
79 *Heliconius* estabelecerem áreas onde eles periodicamente visitam manchas com recursos para
80 adultos e plantas hospedeiras procurando por parceiros sexuais. O viés dessa estratégia é a
81 probabilidade baixa que os machos têm de encontrar parceiras receptivas devido à monandria
82 da fêmea, o que levou a uma “corrida sexual” entre os machos para determinar quem tem
83 acesso primeiro ao maior número de fêmeas virgens, já que a prole de um macho aumenta
84 proporcionalmente com relação ao número de fêmeas com quem ele copula (Andersson &
85 Iwasa 1996).

86

87

88 Essa disputa por cópulas fez com que os machos procurassem cada vez fêmeas mais
89 jovens – chegando ao extremo de localizar e guardar parceiras sexuais ainda imaturas, forma
90 como é descrito o cruzamento pupal no trabalho de Deinert (2003). Mais precisamente essa
91 estratégia sexual tão extrema pode ser definida como: procura e guarda de pupas fêmeas até a
92 sua emergência, sendo dividida em três etapas: procura, inspeção e competição. Na primeira
93 etapa o macho procura ativamente por pupas fêmeas na natureza, vistoriando sítios de
94 emergência, oviposição e alimentação. Na segunda etapa ocorre a inspeção dessas pupas, feita
95 diariamente para que o macho possa ter acesso a informações sobre o grau de
96 desenvolvimento da pupa fêmea, isto é, sua idade. Por fim ocorre a competição entre os
97 machos, separada em duas fases: a primeira é a competição por posição na pupa, quando ela
98 está prestes a emergir; a segunda, com a fêmea já emergente, pelo acasalamento propriamente
99 dito com a borboleta. Muitas vezes essa cópula se dá com a fêmea ainda em processo de
100 emergência, com as asas em expansão, como já foi observado para a espécie *Parnassius*

101 *phoebus* (Alcock 2001). Em *Heliconius hewitsoni* o caso é mais extremo, os machos perfuram
102 a pupa da fêmea com o abdômen e a cópula ocorre antes da fêmea eclodir (Deinert et al. 1994
103 e 2003).

104

105

106 Vários tipos de cruzamento pupal ocorrem dispersos entre ordens de insetos (Deinert
107 2003). Dentro da Ordem Lepidoptera esse comportamento é observado somente em outro
108 gênero fora *Heliconius* (gênero *Laparus*), sendo que antigamente estes dois eram classificados
109 em um único grupo. Essas informações, juntamente com o trabalho de Beltrán et al. (2007),
110 sustentam a hipótese da existência de um clado monofilético para o cruzamento pupal,
111 demonstrando que esta estratégia evoluiu somente uma vez dentro do gênero *Heliconius*. Da
112 mesma forma, Gilbert (1991) argumenta que essa característica sexual tão incomum teria um
113 papel importante na expansão filogenética das *Heliconius*, evitando, por exemplo, a confusão
114 entre pares de espécies miméticas com diferentes táticas de acasalamento.

115

116

117 A evolução do cruzamento pupal pode ter sido desencadeada pela monandria das fêmeas
118 que, tornando-se receptivas ainda em pupa, geram intensa competição entre machos, da qual a
119 fêmea pode se beneficiar por exercer o que é chamado de “escolha indireta de parceiros”
120 (Mendoza-Cuenca et al. 2009), um tipo de seleção intrasexual que ocorre por meio da própria
121 competição entre os machos; logo, a fêmea não escolhe ativamente com quem vai copular. A
122 monandria é uma característica também observada em *Lariophagus distinguendus*, uma
123 espécie de vespa cujos machos que emergem depois dos outros estão sobre forte pressão
124 seletiva e têm maior probabilidade de encontrar predominantemente fêmeas já copuladas.

125 Nesse caso, para aumentar a chance de copular, os machos mimetizam o feromônio sexual
126 feminino, confundindo os machos que emergem antes deles (Steiner et al. 2005).

127

128

129 A competição para encontrar parceiros sexuais levou ao desenvolvimento de diversos
130 artifícios - como o mimetismo intra-específico já descrito em *Lariophagus distinguendus* - ou
131 então habilidades espaciais que permitem a localização de pupas fêmeas em plantas
132 hospedeiras dias antes de sua eclosão (Brower 1997). Os machos de *Heliconius erato phyllis*
133 que tiverem desenvolvido esse refinamento de habilidades - sejam elas espaciais,
134 morfológicas ou químicas - possuem uma vantagem competitiva devido à variação de *status*
135 da pupa fêmea. Essa variação, que ocorre devido à produção de feromonios de atração pela
136 pupa fêmea, indica a idade desta, sendo que quanto mais velha a pupa for – por estar mais
137 perto de emergir - ela se torna mais valiosa.

138

139

140 Também se sabe que existe um grande gasto energético para afugentar os adversários e
141 se manter dentro da competição pela cópula, por isso os machos só conseguem brigar por um
142 território por poucas horas (Alcock 2001). Logo, se o macho não for capaz de distinguir essa
143 variação no *status* da pupa fêmea, pode ter um comprometimento energético grande caso
144 pouse em uma pupa que ainda é muito jovem, pois vai acabar perdendo tempo e energia com
145 uma possível cópula que está longe de acontecer. Ao contrário, se ele tiver essa capacidade,
146 pode de certa forma melhor distribuir o seu tempo, maximizando o número de parceiras pelas
147 quais ele vai competir.

148

149

150 Algumas pesquisas já foram realizadas sobre cruzamento pupal e seus componentes
151 comportamentais, ambientais e genéticos dentro do gênero *Heliconius*, como por exemplo,
152 Deinert et al. 1994, que trata de competição por cópula; Mendoza-Cuenca et al. de 2009, que
153 trata da ação de seleção disruptiva sobre as estratégias sexuais em *Heliconius charitonia*;
154 assim como Estrada et al (2009), que trata da produção de pistas químicas por imaturos de
155 *Heliconius charitonia* como forma de evolução do comportamento de guarda. No entanto,
156 faltam publicações que descrevam detalhadamente o cruzamento pupal e seus componentes
157 principais na espécie *Heliconius erato phyllis*, assim como já foi feito para outros heliconíneos
158 como no trabalho de Deinert (2003) para *Heliconius hewitsoni*.

159

160

161 Assim como foi feito para o comportamento de cortejo sexual (Klein e Araújo, 2010), a
162 elaboração de uma pesquisa como esta se justifica pela escassez de trabalhos que analisem a
163 estratégia de cruzamento pupal em *Heliconius erato phyllis*, espécie de borboleta neotropical
164 com maior distribuição geográfica na América do Sul dentro do gênero *Heliconius*, além de
165 preencher uma lacuna existente nos estudos sobre Lepidoptera. Neste trabalho procura-se
166 analisar os componentes comportamentais envolvidos na estratégia de cruzamento pupal na
167 espécie *Heliconius erato phyllis* – frequência de inspeção e pouso em pupas de diferentes
168 idades e sexo, quando os machos distinguem o sexo da pupa, se o tamanho da asa do macho
169 pode ser preditor de sucesso na cópula e se um macho pode mudar de estratégia sexual
170 durante a vida de acordo com a disponibilidade de cópulas.

171

172

173 **MÉTODOS**

174

175

176 *Manutenção dos estoques de machos*

177

178

179 A manutenção dos machos adultos de *Heliconius erato phyllis* foi feita em viveiros de
180 2 x 2 x 3 metros em área adjacente ao Departamento de Genética da UFRGS, no Campus do
181 Vale (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Os viveiros ficam expostos às condições
182 climáticas diárias e são compostos por vegetação variada e mudas de *Passiflora misera* e *P.*
183 *suberosa*, onde as fêmeas de *H. erato phyllis* ovipositam. A alimentação das borboletas foi
184 feita diariamente, por meio de uma solução de água, mel e pólen disponibilizada em pequenos
185 recipientes. Todos esses machos adultos utilizados nos experimentos foram identificados com
186 um número, uma letra ou um símbolo na face ventral das asas anteriores, para que pudessem
187 ser distinguidos das borboletas recém emergidas das pupas e para que o indivíduo que obteve
188 sucesso na cópula no fim do experimento pudesse ser identificado. Sempre que um macho
189 morria este era substituído por outro para que se mantivesse a mesma quantidade de adultos
190 disponíveis, sendo que mensalmente as populações de machos dos viveiros sofriam pequenas
191 alterações.

192

193

194 *Manutenção dos estoques de pupas*

195

196

197 As pupas utilizadas nos experimentos tiveram origem na criação de ovos de *H. erato*
198 *phyllis* feita no laboratório, sob temperatura (24-26°C) e umidade controladas. Os ovos são
199 coletados diariamente de viveiros contendo fêmeas já copuladas, levados ao laboratório e

200 depositados em copos plásticos com tampa até a emergência das lagartas, quando começam a
201 receber diariamente folhas novas de *Passiflora misera* e *P. suberosa*. O procedimento tem
202 curso até as lagartas empuparem, quando são sexadas com a ajuda de uma lupa.

203

204

205 *Procedimento experimental*

206

207

208 Os experimentos foram feitos de Janeiro de 2009 a Maio de 2010 e Novembro de 2010
209 a Abril de 2011. Duas pupas foram utilizadas por experimento - um macho e uma fêmea -
210 sendo que elas eram de mesma idade ou de idade similar, não ultrapassando dois dias de
211 diferença. As pupas foram penduradas em ramos de *Passiflora misera* dentro do viveiro
212 (Figura 1), a uma distância de aproximadamente um metro uma da outra, sendo que para isso
213 foi utilizado um barbante cujos fios foram desenrolados para que se pudesse passar por dentro
214 a seda produzida nos segmentos terminais da região abdominal da pupa (cremaster), depois
215 esse barbante era novamente enrolado e pendurado nos ramos de *P. misera*. As posições das
216 pupas variaram de um experimento para o outro, ou seja, uma pupa macho não ficava em um
217 mesmo lado do viveiro em experimentos seguidos, alternando com as pupas fêmeas.

218

219 Os experimentos foram realizados durante as manhãs, em dias sem chuva, e tiveram
220 duração de cerca de 30 minutos. Neste período todas as aproximações dos machos às pupas
221 foram anotadas em uma tabela: ou como inspeção – qualquer aproximação de uma borboleta
222 adulta a uma pupa, sendo que essa aproximação se dá a poucos centímetros do objeto
223 inspecionado, eventualmente resultando no toque rápido desta pelas pernas e antenas do
224 adulto (Figura 2); ou como pouso – quando uma borboleta adulta pouso seus apêndices

225 locomotores sobre a pupa e assim permanece por mais de 1 segundo (Figura 3). Da mesma
226 forma, no fim do experimento registrou-se o macho que obteve sucesso na cópula. As
227 observações foram feitas com a intenção de se obter uma mesma quantidade de registros por
228 dia/idade das pupas, acumulando informação suficiente sobre cada etapa do processo pupal,
229 sendo que cada par de pupa era observado durante todo o estágio pupal até a sua emergência.

230

231

232 *Medida da asa como preditor de sucesso*

233

234

235 Os machos adultos utilizados nos experimentos tiveram suas asas esquerdas medidas
236 por meio de um paquímetro (Mitutoyo). Esse experimento teve como base o trabalho de
237 Deinert et al. de 1994, que mostrou que aqueles machos que pousavam sobre as pupas tinham
238 em média o tamanho da asa maior do que aqueles que não pousavam, e que aqueles que
239 obtinham sucesso na cópula tinham o tamanho da asa menor dentre aqueles que conseguiam
240 pousar, o que resultava em machos vencedores com tamanho de asa dentro da média
241 populacional. As informações obtidas nesse experimento serão utilizadas para prever se esse
242 tipo de seleção também ocorre para *Heliconius erato phyllis*.

243

244

245 *Troca de estratégia sexual*

246

247

248 No ultimo mês de experimentos quatro machos que obtiveram sucesso na cópula por
249 cruzamento pupal foram transferidos para outro viveiro onde foram liberadas juntamente duas

250 fêmeas adultas virgens. Esse experimento teve como objetivo observar se os machos que
251 obtiveram sucesso no cruzamento pupal também podiam obter sucesso no acasalamento por
252 meio da outra estratégia sexual presente na espécie, a cópula precedida por cortejo. As
253 informações obtidas serão utilizadas para prever se os machos de *Heliconius erato phyllis*
254 trocam de estratégia sexual durante a sua vida dependendo da disponibilidade de pupas
255 fêmeas.

256

257

258 *Análise dos dados*

259

260

261 Para as variáveis quantitativas, foram utilizados testes paramétricos (comparação entre
262 médias, teste t); para as variáveis categóricas foi utilizado o teste não-paramétrico do Qui-
263 quadrado. Todos os cálculos foram feito por meio do programa Bioestat 5.0, considerando-se
264 um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

265

266

267 RESULTADOS

268

269

270 *Descrição dos comportamentos*

271

272

273 Foram realizadas 126 observações em viveiro, durante as quais foi possível registrar as
274 atividades em 20 pares de pupas (20 machos e 20 fêmeas), resultando em um esforço

275 equivalente a 32 horas e 30 minutos de observação. Das vinte pupas fêmeas penduradas uma
276 morreu com 6 dias, 11 foram observadas até a emergência, e nas 8 restantes foi possível
277 registrar o acasalamento, com anotação do respectivo macho com quem ocorreu a cópula.
278 Quanto às pupas machos, duas delas morreram, provavelmente predadas por formigas ou
279 outros insetos, já que somente parte da exúvia foi encontrada; das outras 18 pupas foi possível
280 observar a emergência de 12 delas. Os comportamentos anotados a partir da observação dos
281 machos adultos foram divididos em duas classes: inspeção e pouso, sendo que das 804
282 atividades comportamentais registradas, 90% foram classificadas como inspeção, e os outros
283 10% como pouso.

284

285

286 No total foram registrados 723 eventos de inspeção, sendo 435 em pupas fêmeas
287 (60%) e 288 em pupas macho (40%) ($\chi^2=29,88$; $gl=1$; $p=0,0001$). Dentre os pares de pupas
288 utilizados, o que obteve maior registro de inspeções resultou em 69 inspeções para a pupa
289 fêmea, enquanto que o macho obteve 92. A média de inspeções para cada dia em estágio
290 pupal nas pupas do sexo masculino foi de $22,1 \pm 28,2$ (desvio padrão); enquanto que nas do
291 sexo feminino foi de $33,5 \pm 30,2$; sendo que as diferenças não são estatisticamente
292 significantes ($t=0,9863$; $gl=24$; $p(\text{unilateral})=0,1669$), porém elas seguem o mesmo padrão
293 obtido para os valores totais, o que pode sugerir que a insignificância venha de um tamanho
294 amostral pequeno. Com relação ao comportamento de pouso, foram registrados 81 eventos,
295 sendo 53 em pupas fêmeas (65,4%) e 28 em pupas machos (34,6%) ($\chi^2=7,716$; $gl=1$;
296 $p=0,0055$). Com relação aos pares de pupas utilizados, o que obteve maior registro de pouso
297 resultou em 10 anotações em pupas machos e 14 em pupas fêmeas. A média desse
298 comportamento para cada dia em estágio pupal foi maior em pupas fêmeas, resultando em 4,1

299 $\pm 5,3$; enquanto que em machos foi de $2,1 \pm 3$; porém as diferenças não são estatisticamente
300 significativas (teste $t = 1,129$, $gl=24$, $p(\text{unilateral})=0,135$).

301

302

303 Durante as observações, não foi possível atingir o mesmo número de registros para
304 cada idade pupal (dias em que o indivíduo permanece no estágio de pupa), com menor
305 frequência nos dias um, dois, sete e oito devido à morte das pupas ou problemas climáticos.
306 Dessa forma, objetivando um resultado mais parcimonioso de como seriam as distribuições de
307 frequência dos comportamentos, foram calculadas as médias de inspeção e pouso para cada
308 idade pupal e sexo (Figuras 4 e 5).

309

310

311 A distribuição das médias do comportamento de inspeção por idade pupal (Figura 4)
312 sugerem uma frequência constante de visitas, tanto em pupas machos como em pupas
313 fêmeas, com leves oscilações; sendo que durante todo o período os valores de inspeção para
314 pupas fêmeas se mantem maiores do que para pupas machos (com exceção do décimo dia).
315 Nota-se também que nos últimos dias de estágio pupal, mesmo com a proximidade da
316 maturação, a frequência de inspeção não parece sofrer um aumento brusco, com exceção do
317 décimo primeiro dia. Já a distribuição das médias de pouso por idade pupal (Figura 5)
318 insinuam um padrão bimodal, devido à interrupção desse comportamento no sétimo dia. Nos
319 primeiros dias de estágio pupal as frequências de pouso são muito pequenas e quase não
320 mostram diferença entre os dois sexos. Já nos últimos dias de pupa, quando ela está próxima
321 de emergir, nota-se que as médias obtidas sofrem um aumento drástico. Quando se faz a
322 média das médias dos comportamentos de inspeção e pouso, nos dois casos o resultado é

323 maior em pupas fêmeas, sendo 4,3 inspeções e 0,66 pousos por dia; no caso dos machos o
324 resultado foi de 1,8 inspeções e 0,21 pousos por dia.

325

326

327 A partir da sugestão de um padrão bimodal de distribuição das médias para o pouso,
328 utilizou-se o teste do qui-quadrado para prever se os valores observados entre os dois picos
329 (até 7 dias e após 7 dias) diferem significativamente. As frequências absolutas de pouso
330 obtidas para fêmeas foram de 19 para pupas com até 7 dias e 34 para pupas com mais de 7
331 dias. Em machos esses valores foram de 8 para pupas com até 7 dias e 20 para pupas com
332 mais de 7 dias. O resultado do teste não foi estatisticamente significativo ($\chi^2=0,171$, com
333 correção de Yates, $gl=1$, $p=0,67$).

334

335

336 *Tamanho da asa*

337

338

339 Dos 29 machos utilizados em algum momento nos viveiros foi possível medir o
340 tamanho da asa anterior de 23 deles, os outros 6 acabaram morrendo antes do fim dos
341 experimentos e não foi possível encontrar as asas. Os resultados obtidos estão ilustrados na
342 tabela 1. A média calculada para a população foi de $37,6 \pm 1,9$ mm; com um mínimo de 31,4
343 mm e máximo de 40,2 mm. Dos 23 machos, 7 obtiveram sucesso na cópula por cruzamento
344 pupal, sendo que somente um copulou duas vezes. A média do tamanho da asa para esses
345 machos foi de $37,4 \pm 1,3$ mm; com um mínimo de 35,0 mm e máximo de 38,9 mm. As médias
346 são muito parecidas, não diferindo significativamente (teste $t=0,234$; $gl=28$;
347 $p(\text{unilateral})=0,408$).

348

349

350 Outra comparação foi feita levando em consideração somente a população de machos
351 adultos presente em cada viveiro durante cada experimento. A tabela 2 descreve a média da
352 população presente nos viveiros no momento de cada uma das 8 cópulas observadas e o
353 tamanho da asa do macho que copulou, além dos valores da distribuição z obtidos. Não foram
354 observadas diferenças estatísticas entre o tamanho dos machos que tiveram sucesso
355 copulatório e o tamanho médio populacional, sugerindo que não há vantagem adaptativa em
356 função do tamanho.

357

358 *Troca de estratégia sexual*

359

360

361 Quando colocados em contato com as duas fêmeas virgens, dois dos quatro machos
362 utilizados que obtiveram sucesso no cruzamento pupal foram capazes de trocar de estratégia
363 sexual e obter sucesso na cópula por meio do cortejo nos dois experimentos feitos, sendo que
364 esta não demorou mais de um dia para ocorrer em nenhum dos casos. Os resultados sugerem
365 que esta espécie possui a capacidade de trocar de estratégia sexual.

366

367

368 DISCUSSÃO

369

370

371 *O cruzamento pupal em H. erato phyllis*

372

373

374 O cruzamento pupal em *H. erato phyllis* é uma estratégia sexual composta por diversos
375 componentes etológicos, dentre eles: a inspeção, que acumulou 90% dos comportamentos
376 registrados no total; e o pouso, que obteve 10%. Da mesma forma, foi calculada para pupas
377 machos e fêmeas uma porcentagem de 91% e 89% de inspeções, respectivamente. Por
378 intermédio da inspeção o macho consegue localizar pupas na natureza, além de obter
379 informações sobre a maturidade e, possivelmente, sobre o sexo da pupa, mantendo um
380 controle do seu *status* e conseqüentemente do quão próximo ela está de emergir. O pouso, por
381 outro lado, permite que o macho entre na disputa pela parceira sexual, assegurando seu espaço
382 próximo a ela até o momento de sua emergência. Devido às informações possíveis de serem
383 obtidas a partir da inspeção (localização, maturação e sexo pupal), é plausível que este
384 comportamento ocorra em uma frequência muito maior do que o pouso, independente do sexo
385 pupal, pois a descoberta deste ocorre somente nos últimos dias deste estágio (Deinert 2003).

386

387

388 Os valores totais encontrados, tanto do comportamento de inspeção quanto de pouso,
389 foram significativamente maiores em pupas fêmeas do que em pupas machos, corroborando a
390 hipótese de que ocorre distinção do sexo pupal pelo macho adulto. A partir destas conclusões
391 infere-se que exista alguma pista ajudando os machos adultos de *Heliconius erato phyllis* a
392 realizar a distinção entre pupas fêmeas e pupas machos; assim como ocorre para *Heliconius*
393 *charitonia*, a partir da produção de feromônios de atração pelas pupas fêmeas (Estrada et al.
394 2009). Mesmo que as diferenças obtidas nas médias de inspeção e pouso por dia entre os
395 sexos não tenham sido estatisticamente significantes, elas também foram maiores em pupas
396 fêmeas do que em pupas machos, sendo compatível com o que se conhece da fisiologia pupal

397 (produção de feromônios nos últimos dias de estágio pupal). Dessa forma, esse último
398 resultado pode ser justificado pelo número amostral baixo.

399

400

401 A liberação de feromônios durante o desenvolvimento pupal pode aumentar a chance
402 das fêmeas de serem inseminadas imediatamente após emergirem. O que é de particular
403 importância se os feromônios produzidos forem de curta distância (Estrada & Gilbert, 2010),
404 pois se torna mais difícil de localizá-las após terem deixado o sítio de emergência para
405 procurar novas plantas hospedeiras (Steiner et al. 2005). No caso dos resultados apresentados
406 aqui, os feromônios de curta distância podem ser a justificativa para os erros de pouso
407 registrados em pupas machos nos últimos dias de estágio pupal. A proximidade das pupas no
408 viveiro deve ter provocado uma pequena confusão química quando a pupa fêmea, atingindo a
409 maturidade, começou a produzir feromônios de atração.

410

411

412 Também foi observada em um dos experimentos uma tentativa de cópula com uma
413 pupa macho (Figura 6). Neste caso, durante alguns minutos as borboletas competiram por
414 posição nessa pupa, sendo que a borboleta identificada como A3 tentou a cópula por alguns
415 segundos com o macho emergente. O evento durou menos de 1 minuto, depois do qual houve
416 a desistência da borboleta adulta. Thornhill (1983) reconheceu que parte dos erros cometidos
417 por machos no momento de distinção ou percepção do sexo pupal se dão devido à “grande
418 vontade de copular” que estes possuem, levando-os a reconhecer uma pista geral ao invés de
419 uma altamente específica e limitada às fêmeas, que seria o caso do feromônio. Novamente,
420 este equívoco pode ser justificado pela pequena distância entre as pupas (aproximadamente 1
421 metro), limitada pelo espaço do viveiro, assim como pelo estresse causado aos machos em

422 viveiro devido à baixa disponibilidade de parceiras sexuais, permitindo a generalização de
423 pistas.

424

425

426 Com relação à distribuição das médias dos comportamentos de inspeção e pouso para
427 cada idade pupal (figuras 4 e 5), os resultados observados diferiram das expectativas
428 aguardadas. Esperava-se que em pupas fêmeas a frequência de inspeção se mantivesse
429 constantemente alta, já que este comportamento, a princípio, poderia levar o macho a
430 descobrir a maturação, localização e sexo da pupa. Com relação à frequência de pouso,
431 esperava-se que fosse nula no começo e que aumentasse gradativamente nos últimos dias (pois
432 quanto mais velha é a pupa, mais próxima ela está de emergir). Com relação às pupas do sexo
433 masculino, esperava-se que a frequência de inspeção, ao invés de se manter constante, deveria
434 reduzir ao longo dos dias – processo desencadeado pela descoberta do sexo pupal - assim
435 como a frequência de pouso deveria ser baixa desde o início, se não inexistente.

436

437

438 Assim, quando se analisa as figuras 4 e 5, não são estas as tendências observadas. A
439 inspeção possui uma frequência constante, tanto em pupas machos como em pupas fêmeas,
440 sendo que as médias são levemente maiores nos últimos dias, porém elas não são altas, como
441 se esperava. Já o pouso parece, sim, ocorrer em menor quantidade em pupas jovens,
442 aumentando consideravelmente a frequência nos últimos dias de estágio pupal, porém essa
443 mesma frequência também ocorre em machos, mesmo que não seja tão alta.

444

445

446 A inspeção parece ser um comportamento que não sofre declínio a partir da descoberta
447 do sexo pupal, servindo durante todo o processo para manter o macho informado sobre
448 maturidade, localização e sexo da pupa, além de indicar quando seria o melhor momento para
449 começar a disputar por esta sem ter grandes gastos energéticos (Deinert 2003). Porém, esta
450 frequência constante nas médias de inspeção pode ser devido ao baixo número amostral, já
451 que Deinert (2003) já havia obtido resultados sobre *Heliconius hewitsoni* que demonstravam
452 ocorrer uma variação maior na frequência de inspeções entre o início e o final do estágio
453 pupal. Deinert (2003) ainda sugere que muitos machos são atraídos para o local onde estão as
454 pupas devido à grande movimentação causada por aquelas borboletas que pousam primeiro.
455 Sob esse argumento, é possível supor que à proximidade das pupas utilizada no delineamento
456 experimental do trabalho aqui apresentado, tenha causado o leve aumento de inspeções
457 observado em pupas machos no fim do estágio pupal.

458

459

460

461 Sabe-se que os feromônios femininos, em borboletas diurnas, tem ação em curtas
462 distâncias, logo é possível justificar as distribuições das médias de pouso se considerarmos
463 que a distinção do sexo pupal pelo macho adulto ocorre no final da maturação desta, de dois a
464 três dias antes da eclosão da pupa, quando esta começa a produzir o feromônio de atração
465 (Deinert 2003; Estrada et al. 2005). Uma explicação é a de que a inspeção e conseqüente
466 descoberta do sexo da pupa incitariam o aumento da frequência de pousos registrados nas
467 pupas, sendo que as poucas observações deste comportamento em machos nesse período seria
468 um equívoco causado pela proximidade das pupas. Da mesma forma, é prejudicial para o
469 macho que este pouse em pupas muito jovens devido ao grande gasto energético envolvido

470 neste comportamento, o que justificaria a baixa frequência de pousos observada nos dias
471 iniciais do estágio pupal.

472

473

474 Trabalhos experimentais que calculem o tempo gasto em cada atividade de inspeção e
475 pousos também são necessários, com o intuito de inferir com maior precisão sobre a diferença
476 desses dois comportamentos entre pupas machos e fêmeas e quando ocorreria a distinção do
477 sexo pupal pelo macho adulto. Deinert (2003) chegou a resultados que demonstravam que os
478 padrões de visitas eram diferentes durante estágio pupal, sendo que as inspeções eram mais
479 frequentes e curtas no começo do desenvolvimento pupal e menos frequentes e mais longas no
480 final. Da mesma forma, as diferenças entre as atividades de pousos sobre pupas machos e
481 fêmeas talvez esteja na duração do comportamento, além da sua frequência.

482

483

484 *Tamanho da asa*

485

486

487 Vários fatores - tanto comportamentais como morfológicos - podem interferir no sucesso
488 de um macho durante o processo de competição no cruzamento pupal. No caso de *Heliconius*
489 *charitonia*, um fator preditor de sucesso foi o tempo que os machos passavam pousados nas
490 pupas (Mendonza-Cuenca et al. 2009). Em *Heliconius hewitsoni* o que interferiu no sucesso
491 dos machos no cruzamento pupal foi “estar presente no dia em que iniciava a competição
492 direta pela pupa” (Deinert 2003). Da mesma forma, alguns fatores morfológicos como
493 tamanho da asa também podem influenciar no sucesso reprodutivo em *Heliconius hewitsoni*
494 (Deinert 1994).

495

496

497 Como discutivo anteriormente, o cruzamento pupal é uma estratégia sexual composta
498 por duas fases de seleção sexual. Na primeira – quando os machos competem por posição na
499 pupa – ter asas grandes e, conseqüentemente um corpo maior (já que esta medida é
500 diretamente relacionada à outra), parece ser um fator relevante, pois garante um melhor
501 desempenho durante as “lutas”, assim como um maior estoque de energia, capacitando a
502 permanência por mais tempo em uma mesma posição sem ter que se alimentar. Já na segunda
503 fase da competição – que seria pela cópula propriamente dita - ter um abdômen menor, e
504 conseqüentemente menor tamanho de asa, garante maior facilidade e mobilidade ao macho
505 adulto para inserir e acoplar seu aparelho genital ao da fêmea em emergência.

506

507

508 Os mesmos tipos de seleção parece ocorrer em *Heliconius erato phyllis*, como pode ser
509 visto na tabela 2. Os resultados obtidos sugerem que os machos que possuem um tamanho de
510 asa dentro da média populacional tendem a obter mais sucesso no cruzamento pupal. Esse
511 padrão é possível caso houvesse uma seleção estabilizadora agindo sobre o comportamento
512 sexual da espécie, onde os extremos são eliminados em fases diferentes do processo de
513 seleção sexual (Deinert 1994). Como o tamanho da asa e o tamanho corpóreo são fatores
514 morfológicos altamente correlacionados, e como a seleção neste caso agiria em direções
515 opostas nos dois momentos da competição, o efeito líquido final não é perceptível (Figura 7),
516 portanto as médias se manteriam iguais às da população.

517

518

519 *Troca de estratégia sexual*

520

521

522 Existem alguns fatores ambientais como distribuição espacial e temporal de parceiros
523 sexuais, assim como proporção dos sexos em uma população, que podem ser elementos
524 importantes no surgimento e manutenção dos sistemas de acasalamento dentro de uma
525 espécie, pois como citado por Mendoza-Cuenca et al. (2009), estabelecem a força e
526 oportunidade para a seleção sexual. Em *Heliconius charitonia*, o sistema de acasalamento
527 funciona a partir de um fator ambiental (assincronia na receptividade de pupas fêmeas), que
528 teria favorecido a ação de uma seleção disruptiva sobre as estratégias sexuais, de forma que os
529 machos não são vistos trocando de estratégia sexual durante a vida.

530

531

532 Diferentemente, os machos de *Heliconius erato phyllis* aparentemente utilizam
533 estratégias alternativas de cópula durante sua vida, talvez como forma de compensação pela
534 variação na disponibilidade de pupas fêmeas, principalmente porque a oferta destas é muito
535 baixa na primavera (período quando inicia a colonização), tornando a estratégia de
536 cruzamento pupal muito custosa para o macho desta espécie pela raridade de pupas fêmeas. Já
537 durante o outono a densidade de pupas é alta, e nesse período é possível observar os machos
538 adultos de *Heliconius erato phyllis* utilizando as duas estratégias sexuais (cruzamento pupal e
539 cópula precedida por cortejo), dessa forma nenhuma pupa ou fêmea acessível deixa de se
540 tornar uma parceira sexual em potencial. Entretanto, como *Heliconius charitonia* possui uma
541 densidade populacional pouco variável, não se torna desfavorável para a espécie que os
542 machos utilizem somente uma estratégia sexual durante sua vida, pois sempre terão fêmeas ou
543 pupas disponíveis. Já para *H. erato phyllis*, não é favorável para o macho utilizar somente uma
544 estratégia sexual, devido às oscilações na densidade de fêmeas e pupas durante o ano.

545

546

547 No caso de *H.erato phyllis* o que parece estar ocorrendo, de acordo com vários
548 trabalhos demográficos já realizados no Rio Grande do Sul, é uma alternância entre
549 cruzamento através de corte a partir da metade da primavera, quando a densidade de pupas é
550 baixa devido à recolonização das populações, até um período onde a densidade de borboletas é
551 alta, nos meses de março, abril e maio, onde devem ocorrer muitos cruzamentos pupais
552 juntamente com cruzamentos via corte.

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570 AGRADecIMENTOS

571

572

573 Agradecemos a todas as pessoas que colaboraram com a criação dos indivíduos em
574 viveiros e laboratório (Ana Carolina Bahy Aimone, André Luis Klein, Bruna Missaglia,
575 Camila Horbach, Janaína De Nardin, Luciana da Silva e Marcelo Costa). Ao Conselho
576 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, e pela
577 concessão de uma bolsa de Iniciação Científica (programa PIBIC CNPq/UFRGS).

578

579

580 Agradeço ainda aos meus pais e companheiro, que assumiram junto comigo os
581 passeios de fim de semana até o campus para cuidar da criação; aos amigos, sempre curiosos e
582 questionadores; e ao meu orientador, Aldo Mellender de Araújo, pelo apoio teórico e pela
583 confiança de que eu seria capaz de comandar esse projeto sozinha.

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595 BIBLIOGRAFIA

596

597

598 **Alcock, J.** 2001. *Animal behavior - An evolutionary approach*. Arizona State University, 543
599 p.

600

601 **Andersson, M. & Iwasa, Y.** 1996. Sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*. **11**, 53-
602 58.

603

604

605 **Beltrán, M., Jiggins, C. D., Brower, A. V. Z., Bermingham, E. & Mallet, J.** 2007. Do
606 pollen feeding, pupal-mating and larval gregariousness have a single origin in *Heliconius*
607 butterflies? Inferences from multilocus DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean*
608 *Society*, **92**, 221-239.

609

610

611 **Brower, A. V. Z.** 1997. The evolution of ecologically important characters in *Heliconius*
612 butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a cladistic review. *Zoological Journal of the Linnean*
613 *Society*, **119**, 457–472.

614

615

616 **Deinert, E. I., Longino, J. T. & Gilbert, L. E.** 1994. Mate competition in butterflies. *Nature*,
617 **370**, 23-24.

618

619

620 **Deinert, E. I.** 2003. Mate location and competition for mates in a pupal mating butterfly. In
621 *Butterflies – Ecology and evolution taking flight* (Ed. By Carol L. Boggs, W. B. Watt & P.
622 Ehrlich). University of Chigado. 91-108.
623
624
625 **Estrada, C. & Gilbert, L. E.** 2010. Host plants and immatures as mate-searching cues in
626 *Heliconius* butterflies. *Animal Behavior*, **80**, 231-239.
627
628
629 **Ferreira, A. A., Garcia, R. N. & Araújo, A. M.** 2006. Pupal melanization in *Heliconius*
630 *erato phyllis* (Lepidoptera; Nymphalidae): genetic and environmental effects. *Genetica*, **126**,
631 133-140.
632
633
634 **Gilbert, L. E.** 1991. Biodiversity of a Central American *Heliconius* community: pattern,
635 process, and problems. In *Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and*
636 *Temperate Regions* (Ed. By Peter W. Price, Thomas M. Lewinsohn, G. Wilson Fernandes &
637 Woodruff W. Benson). New York. 403–427.
638
639
640 **Kaminski, L. A., Tavares, M., Ferro, V. G. & Moreira, G. R. P.** 2002. Morfologia externa
641 dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais. III. *Heliconius erato phyllis* (Fabricius)
642 (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Revista Brasileira de Zoologia*, **19**, 977-993.
643
644

645 **Klein, A. & Araújo, A. M.** 2010. Courtship behavior of *Heliconius erato phyllis*
646 (Lepidoptera, Nymphalidae) towards virgin and mated females: conflict between attraction
647 and repulsion signals? *Journal of Ethology*, **28**, 409-420.
648
649
650 **Mendoza-Cuenca, L. & R, Macías-Ordóñez.** 2009. Female asynchrony may drive disruptive
651 sexual selection on male mating phenotypes in a *Heliconius* butterfly. *Behavioral Ecology*, **21**,
652 144-152.
653
654
655 **Steiner, S., Steidle, J. L. M. & Ruther, J.** 2005. Female sex pheromone in immature insect
656 males – a case of pre-emergence chemical mimicry? *Behavior ecology and sociobiology*, **58**,
657 111-120.
658
659
660 **Thornhill R. & Alcock, J.** 1983. *The evolution of insects mating systems*. Harvard University
661 Press. 546 p.



Figura 1. Pupa de *Heliconius erato phyllis*, pendurada com barbante em ramo de *Passiflora misera*.



Figura 2. Atividade de inspeção de uma borboleta adulta em pupa pendurada em ramo de *Passiflora misera*.



Figura 3. Atividade de pouso de duas borboletas em uma pupa pendurada em ramo de *Passiflora misera*.

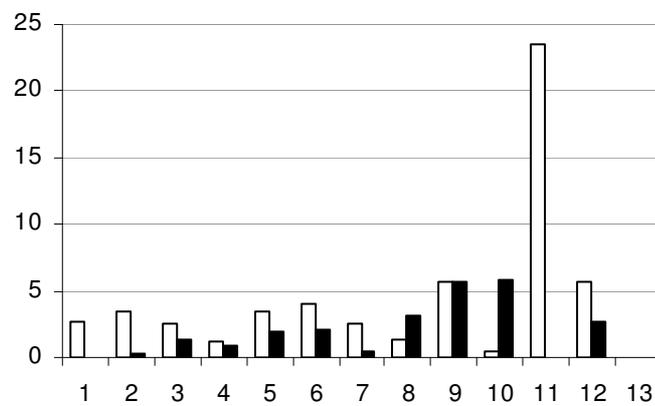


Figura 4. Distribuição das médias de inspeção por idade pupal. Fêmeas são as colunas brancas e machos são as colunas pretas. Eixo Y indica a média de inspeção. Eixo X indica a idade pupal (em dias).

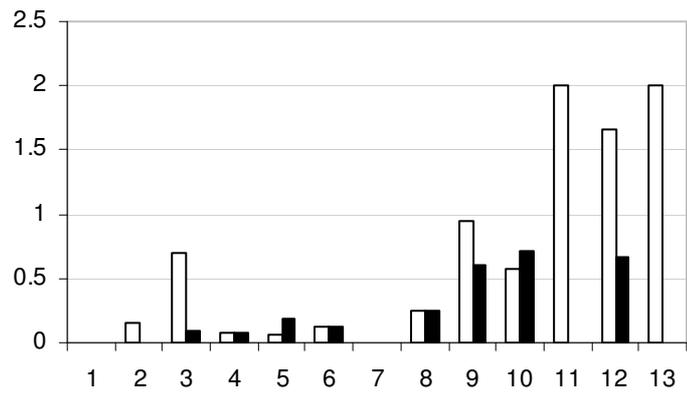


Figura 5. Distribuição das médias de pouso por idade pupal. Fêmeas são as colunas brancas e machos são as colunas pretas. Eixo Y indica a média de pouso. Eixo X indica a idade pupal (em dias).



Figura 6. Cópula registrada entre dois machos. O evento durou menos do que um minuto e houve acoplamento genital.

Tabela 1. Tamanho da asa (Tam. Asa - mm) dos machos adultos utilizados nos experimentos em viveiro.

Macho	Tam. Asa
7	34,97
6	38,39
16	38,37
17	37,22
20	38,01
26	40,25
27	34,97
119	36,43
141	31,40
1 AB	38,38
30 NC	38,95
37 NC	37,52
41 NC	39,21
33 C	38,95
45 C	38,45
46 C	39,36
59 C	36,56
63 C	38,12
80 C	36,73
81 C	39,45
95 C	37,09
A	38,87
B	36,24

Tabela 2. Tamanho de asa para média da população presente no viveiro (Média pop.) e macho que copulou (Macho cop.) nos oito experimentos onde foram observados acasalamentos (os dois valores estão em milímetros). Z= Valor do teste z calculado, p= probabilidade de rejeição da hipótese nula (igualdade de tamanhos); $\alpha=0,05$.

Média Pop.	Macho cop.	Z	p
37,38	34,97	-1,34	0,09
37,38	37,52	0,077	0,47
38,37	37,52	-1	0,16
37,69	38,38	0,423	0,34
38,49	37,22	-1,37	0,08
38,02	38,87	0,734	0,23
37,56	38,12	0,643	0,26
37,44	36,56	-1,17	0,12

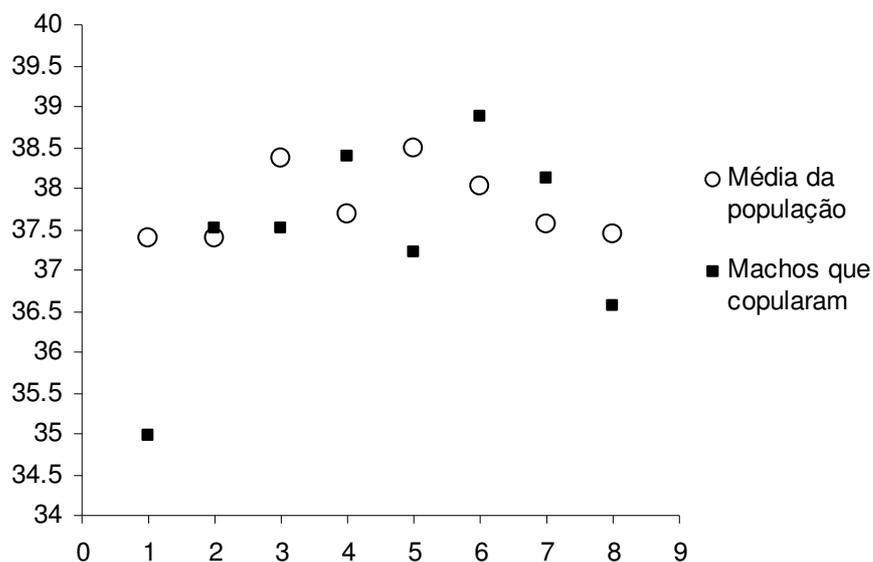


Figura 7. Gráfico de dispersão do tamanho da asa dos machos que copularam e das médias da população presente nos viveiros nos oito experimentos onde foi observada a cópula. Medidas da asa no eixo Y em milímetros. Eixo X corresponde aos experimentos.

Author Guidelines

NEW: Audio/visual material

Authors are encouraged to submit audio and/or visual materials such as animal calls, photographs or videos as supplementary material which will be made available to users in the online version of the article. Please consult the Wiley-Blackwell homepage for acceptable file formats: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>

1. General

Ethology contains articles by scientists from all over the world. It welcomes original contributions from all branches of behavioural research on all species of animals, both in the field and in the laboratory, as well as theoretical investigations. Authors are requested to explain the theoretical framework of their contribution and the general importance of their findings. Perspectives and reviews on current issues, and short essays on controversial topics are especially encouraged.

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

2. Submission and Acceptance of Manuscripts

Ethology manuscripts should be submitted electronically via the online submission site [ScholarOne Manuscripts](#) (formerly known as Manuscript Central). The use of an online submission and peer review site speeds up the decision-making process, enables immediate distribution and allows authors to track the status of their own manuscripts. To access this system for submission and review, please go directly to [ScholarOne Manuscripts](#). Instructions for submitting your manuscript are provided on this site. If you encounter technical problems when submitting your manuscript, please contact *Ethology* ScholarOne Manuscripts Support: Support@ScholarOne.com
phone: (434) 817-2040 ext.167 USA

When you submit your manuscript to *Ethology*, you will need to confirm the following statements:

- I/We adhere to the 'Guidelines for the use of animals in research' as published in *Animal Behaviour* (1991, 41, 183-186) and the laws of the country where the research was conducted.
- The manuscript contains only material that is either original and has not been published or submitted elsewhere, or stems from publications identified by a reference.
- All authors have seen the final manuscript and take responsibility for its contents.

The acceptance or rejection of manuscripts for publication in *Ethology* is decided by the editors, usually in cooperation with two referees. Any manuscript returned by an editor to the corresponding author for revision will be considered as withdrawn if not resubmitted within a period of three months.

Upon acceptance, you will have to complete, sign and send the [Copyright Transfer Agreement Form](#): *without the Copyright Transfer Agreement Form we are legally not permitted to publish any paper*. Authors may suggest names and addresses of potential reviewers that have not been involved in the research project or in the preparation of the manuscript. A cover letter with additional information may accompany the manuscript, but this is not mandatory. Dates of first receipt, initial and final acceptance will be printed in the published paper.

3. Requirements for Manuscripts

3.1 Content

The Abstract should introduce the topic, the main objective, the main result(s) and the principle conclusion(s). The Introduction should explain the main questions addressed in the paper. Continuity with earlier work on the subject should be established by reference to recent papers or reviews, which need not themselves be summarized. Experimental methods must be clearly described and include information essential for replication, but trivial details should be omitted. In the Discussion, the major findings should be summarized as a reminder only, not repeated.

To avoid unnecessary delays in the evaluation process of your manuscript, please consult the [checklist of methods description](#).

3.2 Format

Initial submission

As a rule the manuscript should be arranged as follows: Title page, Abstract (max. 300

words), Introduction, Methods, Results, Discussion, Conclusions (optional), Acknowledgements, Literature Cited. If necessary, these sections may be structured using further subtitles. When different methods apply to different subsections (e.g. describing stand-alone experiments) the Methods and Results for that specific section can be combined. Manuscript layout must have double-line spacing, a left-hand margin of at least 2.5 cm and line numbers throughout the text (use continuous line numbers, if possible). Pages should be numbered from the title page to the figure legends inclusive. Each figure and table should be placed on a separate page.

Both English and American spelling is permissible, but spelling should be used consistently throughout the manuscript.

The first page of the manuscript must contain the following information: title; first name and further initials and surname(s) of the author(s); name and full institutional address of each author (including an E-mail address if available) - if there are multiple authors add '(corresponding author)' after the appropriate name; running title (should not exceed 72 characters, including spaces); the total number of words in the text including the title, references and figure legends.

Final submission

After final acceptance the original manuscript text, tables and files of all figures should be uploaded to the [ScholarOne Manuscripts](#) Author centre. We ask that you convey the essential information of each figure and table within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text.

Please do not import the figures into the text file. Tables should be supplied as text and not as graphics files. The text should be prepared using standard word processors (Microsoft Word) or saved in rich-text (rtf) format. Please note that we are unable to accept files created in PDF or WordPerfect format. Do not use automated or manual hyphenation.

For further information please consult <http://authorservices.wiley.com/bauthor/>.

3.3 Length

Papers, including figures, tables, literature cited, etc. should normally not exceed 12 printed pages which corresponds to approximately 5000 words.

3.4 Units, Abbreviations and Nomenclature

All units of measurement must conform to the SI-System. Days = d, hours = h, minutes = min, seconds = s, grams = g, litres = l, metres = m, sample size = n, median = ('x tilde') or median, arithmetic mean = ('x bar'), degrees of freedom = df, standard error of the mean = SE, standard deviation = SD, probability = p, not significant = ns, year(s) = yr, month(s) = mo, figure = Fig., table = Table, versus = vs, species = sp.

Names of genera and species must be in italics or be underlined with a single line in the manuscript. In the published paper they will appear as italics. All biological names should conform to current international nomenclature. For undefined species use 'sp.' Chemical formulae should be written as fully as possible using the nomenclature of the Chemical Society (J. Chem. Soc. 1067, 1936).

3.5 Illustrations and Tables

At final submission, figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600-1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is acceptable. For more information, please click [here](#).

Colour.

In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Ethology* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher.

Authors using colour in the print issue will be charged and should complete a form which can be downloaded [here](#). Details of charges are given on the form.

Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that a scale provided in the legend might not correspond with the original (microscopic pictures). If a figure is to be cropped, please mark the lines on a photocopy or tracing paper.

Graphs with x and y axes should not be enclosed in frames. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Tables should be created using the table function of your word processor. The use of both tables and figures to illustrate the same results is not acceptable.

3.6 References

References in Articles

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

The list of references must include all references cited in the text and no additional references. References are to be arranged alphabetically and in chronological order. The name of the cited journal should be abbreviated according to the abbreviation used by the journal concerned. Otherwise use the abbreviations contained in the 'Bibliographic Guide for Editors and Authors' from Chemical Abstracts, or the 'World List of Scientific Periodicals', 4th ed., London 1963-65. Anonymous contributions should be placed at the beginning of the list of references.

References should be formatted as in the following examples:

Greenfield, M. D. & Rand, A. S. 2000: Frogs have rules: selective attention algorithms regulate chorusing in *Physalaidius pustulosus* (Leptodactylidae). *Ethology* **106**, 331-347.

Zar, J. H. 1996: *Biostatistical Analysis*, 3rd edn. Prentice Hall, Engelwood Cliffs, New Jersey.

Johnstone, R. A. 1997: The Evolution of Animal Signals. In: *Behavioural Ecology*, 4th edn (Krebs, J.R. & Davies, N. B., eds). Blackwell Science, Oxford, pp. 155-178.

Schütz, D. 1998: Sexual size dimorphism in a shell-brooding cichlid *Lamprologus callipterus*. Ph.D. Thesis, Ludwig-Maximilian-Universität, Munich, Germany.

Articles not yet published may only be cited if their place of publication is certain. They must be denoted by the expression 'in press'. Otherwise, unpublished manuscripts should be referred to in the text as 'author name(s), pers. comm.'; or 'own data'.

Reference to the quoted literature in the text should be given as follows: Smith (1998) or (Smith 1998). Only the first author should be cited followed by 'et al.' when there are more than two authors (Smith et al. 1999). Multiple references to the same author and year should be labelled a, b, etc. according to the order in which they are first cited in the text. Series of references should be in chronological order (Smith 1997a, b; Miller & Smith 2001). Literal quotations should be between quotes "... " and must contain the page number(s) of the original reference.

3.7 Supporting information

Supporting information can be published as web materials on the *Ethology* web site at the

Editor's discretion. The supporting information will be accessible by hot links from the online version of *Ethology*. Authors are responsible for the preparation of supporting information, which should be supplied in a format that will be most accessible by readers (e.g. PDF or Word for text and TIFF/EPS for figures). For more information please see our guidelines at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

4. Copyright Transfer Agreement

Authors will be required to sign a Copyright Transfer Agreement (CTA) for all papers accepted for publication. Signature of the CTA is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless a signed form has been received. Please note that signature of the Copyright Transfer Agreement does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various medium/circumstances (please see the form for further details). To assist authors an appropriate form will be supplied by the editorial office. Alternatively, authors may like to download a copy of the form [here](#).

Completed Copyright Transfer Agreement Forms should be returned to the Production Editor in the first instance. Forms can be sent as a scanned file by e-mail to eth@wiley.com, by FAX to +65 6643 8599, or to the following address by post:

Production Editor

Journal Content Management

Wiley-Blackwell, Wiley Services Singapore Pte Ltd

1 Fusionopolis Walk

#07-01 Solaris South Tower

5. Proof Correction

You will receive proofs of your article without the original manuscript (if no amendments have been made) and an offprint order form. Proofs should be corrected and returned at once. Please be sure that you can be reached during this time. Please note that only typesetting errors are to be corrected.

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded [Here](#) (free of charge). This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

6. Early View

Ethology is now part of the Wiley-Blackwell's Early View service. Articles are published on a regular basis online in advance of their appearance in a print issue. These articles are fully peer reviewed, edited and complete - they only lack page numbers and volume/issue details - and are considered fully published from the date they first appear online. This date is shown with the article in the online table of contents. Because Early View articles are considered fully complete, please bear in mind that changes cannot be made to an article after the online publication date, even if it is still to appear in print.

The articles are available as full text HTML or PDF and can be cited as references by using their Digital Object Identifier (DOI) number. For more information on DOIs, please see <http://www.doi.org/faq.html>.

Early View is a premium service, and as such is automatically available to those with a premium subscription to Wiley Online Library. Authorised users of Wiley Online Library are individuals who either have paid for an online subscription to a journal on Wiley Online Library, or authorised for online access under the terms of their institution's subscription or licence with Wiley-Blackwell. Members of the public may access the open parts of this site in accordance with the Terms and Conditions. Upon registration, single articles are available to purchase on an individual basis. Subscribers to Wiley Online Library are enabled to do the following: access the full-text articles for subscribed-to journals, often in both PDF and HTML format; link to the abstracts of cited articles in other journals using the CrossRef and database links; link forward to articles that cite this article and access Early View articles, where available.

To view all the Early View articles currently available, please [go here](#) and simply click on the 'Early View' tab in the 'Issue Navigation' area at the top of the screen.

As print publication approaches, the article will be removed from the Early View area and will appear instead in the relevant online issue, complete with page numbers and volume/issue details. No other changes will be made.

7. Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for the author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

8. Author Services

NEW: Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

9. NIH Grantees

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.