



La defensa de *Passiflora caerulea* por hormigas reduce el número de huevos y larvas de *Agraulis vanillae*, pero no el daño por herbivoría

GASTÓN SIMONETTI¹ & MARIANO DEVOTO^{1,2}✉

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Cátedra de Botánica General. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. En las comunidades ecológicas, las especies pueden participar de forma simultánea en interacciones interespecíficas de distinto tipo (e.g., depredación, polinización y dispersión), lo que implica que la ocurrencia de una interacción pueda afectar el resultado de otra. Una oportunidad para explorar el efecto de una interacción ecológica sobre otra la brinda el sistema formado por la planta *Passiflora caerulea*, las hormigas que visitan sus nectarios extraflorales y las larvas de la mariposa Espejito (*Agraulis vanillae*), que se alimentan de la planta. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto que tiene el mutualismo entre las hormigas y la planta sobre el antagonismo entre las larvas de mariposa y la planta. Se puso a prueba la hipótesis de que las hormigas protegen a la planta del ataque de las larvas "a cambio" del néctar que reciben. Se realizó un experimento de exclusión de hormigas para explorar si su presencia incide sobre la presencia de huevos y larvas, y el daño que estas producen. Este ensayo se llevó a cabo en el Parque Natural Municipal Ribera Norte (PNMRN), ubicado en el partido de San Isidro, provincia de Buenos Aires, entre septiembre 2011 y marzo 2012. Se registraron cinco morfotipos distintos de hormigas sobre *P. caerulea*. En concordancia con lo que se esperaba, hubo un efecto negativo de las hormigas sobre el número de huevos y larvas de *A. vanillae*. Sin embargo, la presencia de hormigas no afectó el nivel de daño por herbivoría observado. Es decir, el mutualismo de protección tuvo un efecto negativo sobre el herbívoro atacado, pero no pareció tener el efecto positivo esperado sobre la planta defendida. Esto refleja la complejidad de las interacciones tripartitas en los sistemas planta-herbívoro-hormiga y los múltiples factores que pueden influir cómo las especies involucradas resultan afectadas. Desde el punto de vista de la conservación de la biodiversidad y sus funciones en un ambiente amenazado, resulta valioso haber registrado la ocurrencia de estas interacciones en una pequeña reserva ecológica urbana como es el PNMRN.

[Palabras clave: interacción planta-herbívoro, defensa contra herbivoría, reserva urbana]

ABSTRACT. The defence of *Passiflora caerulea* by ants reduces the number of eggs and larvae of *Agraulis vanillae*, but not the damage by herbivory. The system consisting of the plant *Passiflora caerulea*, the ants that visit its extrafloral nectaries and the larvae of the Gulf fritillary butterfly (*Agraulis vanillae*) that feed on the plant provides an opportunity to explore the effect of one ecological interaction on another. The objective of this work was to study the effect of the mutualism between the ants and the plant on the antagonism between the butterfly larvae and the plant. The general hypothesis tested was that ants protect the plant from the attack of the larvae "in exchange" for the nectar they receive. An ant exclusion experiment was conducted to explore whether their presence affects the presence of eggs and larvae and the damage they produce. This experiment was carried out at Parque Natural Municipal Ribera Norte (PNMRN), located in the San Isidro party, in the province of Buenos Aires, between September 2011 and March 2012. Five different ant morphotypes were recorded on *P. caerulea*. According to what was expected, there was a negative effect of the ants on the number of eggs and larvae of *A. vanillae*. However, the presence of ants did not affect the level of herbivory damage observed. In other words, the protection mutualism had a negative effect on the herbivore attacked (in this case, the butterfly), but did not seem to have the expected positive effect on the defended plant (the *Passiflora*). This reflects the complexity of tripartite interactions in plant-herbivore-ant systems and the multiple factors that may influence how the species involved are affected. From the point of view of the conservation of biodiversity and its functions in a threatened environment, it is remarkable to have registered the occurrence of these interactions in a small urban nature reserve such as PNMRN.

[Keywords: plant-herbivore interaction, defence against herbivory, urban reserve]

INTRODUCCIÓN

Las hormigas constituyen uno de los grupos de animales más abundantes y diversos del planeta. Este grupo interactúa con las plantas en formas diversas (Beattie and Hughes 2002). Si bien las interacciones planta-hormiga pueden ser antagonistas (e.g., el daño producido por hormigas defoliadoras), las interacciones positivas, que en términos generales se definen como mirmecofilia, son mucho más comunes (Rico-Gray and Oliveira 2007). Las hormigas pueden polinizar flores, dispersar semillas o proteger a las plantas de herbívoros o de otras plantas competidoras y, a su vez, las plantas pueden proveer a las hormigas de alimento (néctar o cuerpos alimenticios) y refugio (domacios). El tipo de recompensa alimentaria más común es néctar producido en nectarios extraflorales (NEF) que, en general, se encuentran en hojas, tallos o en las proximidades de las estructuras reproductivas de las plantas (Beattie and Hughes 2002), y cuya presencia fue descrita en más de 300 géneros de plantas (Koptur 1991).

Numerosos experimentos de campo mostraron que las hormigas que visitan NEFs y se alimentan de sus secreciones azucaradas defienden a la planta de herbívoros (del Val and Dirzo 2004), lo que suele tener efectos positivos sobre las plantas al reducir el daño por herbivoría, o beneficiar su crecimiento o reproducción (Beattie and Hughes 2002; Heil 2008; Chamberlain and Holland 2009). Si bien en algunos casos estas interacciones son el resultado de una coevolución estrecha entre las especies o grupos de especies involucrados (del Val and Dirzo 2004; Mayer et al. 2014), varios estudios en el nivel de comunidad demostraron que, en general, las interacciones entre hormigas y sus plantas hospederas suelen ser poco específicas y pueden presentar grados diversos de dependencia mutua, desde asociaciones mutualistas obligatorias hasta mutualismos facultativos (Beattie and Hughes 2002). En consecuencia, una especie de planta puede estar asociada con varias especies de hormigas y viceversa (Chamberlain et al. 2010). Las hormigas poseen diferencias cualitativas en su habilidad como defensoras de la planta hospedera, pues hay hormigas más eficientes (más agresivas o que se reclutan de forma más rápida en presencia de herbívoros) que otras (Murase et al. 2003; Bruna et al. 2004). A su vez, la calidad y la cantidad de las recompensas que ofrece la planta afectan la eficiencia con que las hormigas defienden a las plantas; al

mismo tiempo, las condiciones abióticas del ambiente afectan dichas recompensas. Todo esto determina que la existencia o la ruptura de mutualismos planta-hormiga sea muy dependiente del contexto y difícil de predecir (Bronstein 1994; Sachs and Simms 2006).

Una situación interesante se presenta en la defensa contra lepidópteros herbívoros ya que los estadios (huevo, larva y pupa) de la fase inmadura de su ciclo de vida suelen transcurrir enteramente sobre una misma planta. Esto posibilitó estudios experimentales de cómo las hormigas afectan los distintos estadios del ciclo de vida de los lepidópteros. Por ejemplo, las hormigas pueden impactar en el número de huevos que llegan a la planta al desalentar la oviposición (Freitas and Oliveira 1996a), pueden atacar a los huevos (Robertson 1988; López and Potter 2000), o a las larvas y adultos (Oliveira et al. 2012). Sin embargo, pocos trabajos estudiaron de manera simultánea la eficiencia de la defensa biótica que proveen las hormigas en diferentes estadios de un mismo herbívoro, que es lo que aquí se propone.

La conservación de las interacciones entre especies (planta-herbívoro-hormigas, y de otros tipos como planta-polinizador y planta-dispersor) es fundamental para el funcionamiento adecuado de cualquier ecosistema, incluidos aquellos albergados en reservas naturales urbanas (Gaston et al. 2010). En el caso particular de las reservas naturales urbanas, los trabajos que estudian la ocurrencia de interacciones entre especies (Schneiberg De Castro Lima 2017) son escasos. Sin embargo, debido a su área usualmente pequeña y a los disturbios derivados de las actividades humanas (e.g., contaminación, invasión de especies exóticas, remoción de ejemplares), es probable que las interacciones ecológicas en las reservas urbanas sean muy frágiles, aunque no menos importantes que en otros ecosistemas.

El Parque Natural Municipal Ribera Norte (PNMRN) es una pequeña reserva natural urbana en la costa del Río de la Plata. Allí está presente la mariposa *Agraulis vanillae maculosa* (Stichel), que como las otras especies de la tribu Heliconiini (Nymphalidae, Lepidoptera) es un herbívoro especialistas de plantas de la familia Passifloraceae (Benson et al. 1975). En particular, se registraron larvas de *A. vanillae* alimentándose sólo de especies del género *Passiflora*. Esta mariposa es común en parques, jardines y reservas ecológicas urbanas de Buenos Aires (Canals 2000; Nuñez Bustos

2010). Una de sus plantas hospederas, *Passiflora caerulea* L. (Passifloraceae, Malpighiales), está presente en el PNMRN (Bertolini and Deginani 1995). En este contexto, resulta de gran interés verificar si en una reserva urbana ocurren las mencionadas interacciones interespecíficas tripartitas planta-herbívoro-hormiga.

En este trabajo se analizó si la presencia de hormigas nectarívoras en *P. caerulea* incide sobre la presencia de huevos y larvas de *A. vanillae*, y el daño que éstas producen. La hipótesis que se puso a prueba postula que la presencia de hormigas mutualistas en *P. caerulea* regula la herbivoría por larvas de *A. vanillae* que sufre la planta. De esta hipótesis se predijo que en plantas donde se restrinja el acceso de hormigas 1) el número de huevos de mariposa será mayor que en plantas de acceso libre, 2) el número de larvas de mariposa será mayor que en plantas de acceso libre, y 3) el daño foliar producido por herbivoría será mayor que en plantas de acceso libre. Un aspecto novedoso de este estudio es que analiza en forma detallada si la presencia de las hormigas controla a la mariposa en etapas determinadas de su ciclo (huevo y larva). Además, el estudio aportó información sobre el estado de funcionamiento de una reserva ecológica urbana en cuanto a las interacciones entre las especies evaluadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo entre septiembre de 2011 y marzo de 2012 en el Parque Natural Municipal Ribera Norte (PNMRN) (Kalesnik et al. 2005), una reserva ecológica urbana ubicada en la costa del Río de la Plata, en el partido de San Isidro, Provincia de Buenos Aires (34°28'10" S y 58°29'40" O). El clima de la región es templado, con una temperatura media anual de 16.7 °C y una precipitación anual de 1073 mm (Servicio Meteorológico Nacional 1992). El PNMRN protege un humedal costero sujeto al régimen de mareas del Río de la Plata (Minotti et al. 1988) y alberga una riqueza elevada de ambientes y especies vegetales nativas (Bertolini and Deginani 1995).

Passiflora caerulea, comúnmente llamada mburucuyá, es una liana nativa de Sudamérica, distribuida desde la Argentina hasta Venezuela. Es una planta perenne, de 2 a 10 m de altura, con hojas palmadas generalmente pentalobuladas, zarcillos caulinareos, flores vistosas y frutos tipo baya con numerosas

semillas. Se reproduce por semillas. Como la mayoría de especies del género, presenta dos o más nectarios extraflorales en el pecíolo de las hojas (Deginani 2001). Además de la mencionada defensa por hormigas, *P. caerulea* posee otros mecanismos de defensas contra herbívoros como presencia de glucósidos cianogénicos (Seigler et al. 1982), o mimetismo de protección en el que las estípulas se asemejan a larvas de mariposa (Rothschild 1984).

Agraulis vanillae es muy frecuente en todo el continente americano y es típica de ambientes abiertos donde abundan flores y arbustos (Canals 2000; Nuñez Bustos 2010). Las larvas sólo se alimentan de plantas del género *Passiflora* (Cordo et al. 2004; Pastrana 2004 y referencias allí incluidas). Los huevos, que son oblongos y amarillos, son puestos de a uno o en grupos sobre hojas, tallos y zarcillos, con varias posturas anuales y son reconocibles a simple vista (Silva et al. 2006). A los tres días de la oviposición se produce la eclosión de los huevos, momento en que las larvas comienzan su fase alimentaria, en la que primero devoran los restos del huevo y luego continúan con partes de las hojas. En ~20 días, y después de haber concretado la quinta muda, las orugas se convierten en crisálidas. El imago (insecto adulto) emerge luego de siete días. En sus primeros días de adulto, machos y hembras se aparean. Su fase adulta puede durar hasta dos meses.

Respecto de la fauna local de hormigas, no hay información publicada. A su vez, las obras que describen patrones zoogeográficos generales para la región Neotropical (Fernández 2003) o para Sudamérica (Kusnezov 1964) resultan de una utilidad limitada para describir el ensamble potencial de hormigas del PNMRN. Sin embargo, un estudio de la fauna de hormigas de la Reserva Natural de Otamendi, a sólo 60 km al NE del PNMRN, registró 47 especies de hormigas (Fuentes et al. 1998), muchas de las cuales pertenecen a géneros como *Crematogaster*, *Solenopsis*, *Pseudomyrmex* y *Camponotus*, que son comunes en la región (Kusnezov 1978) y que se alimentan de los nectarios extraflorales de *Passiflora* (Janzen 1966; Rico-Gray and Oliveira 2007). Es esperable que muchos de estos géneros estén presentes en el PNMRN y que interactúen con *P. caerulea*.

Para determinar si la presencia de las hormigas afecta la herbivoría de las larvas de mariposa, se realizó un experimento de campo

con un diseño de bloques completos al azar con medidas repetidas. Se plantaron 14 pares (i.e., bloques) de individuos de *P. caerulea* en sitios elegidos al azar dentro de la zona más elevada (albardón) del PNMRN. Las plantas de un mismo par se ubicaron a ~50 cm una de otra. Todas las plantas tenían la misma edad, estado de desarrollo y tamaño (entre 15 y 20 hojas relativamente jóvenes y expandidas al ser plantadas), de manera que se controlaron posibles diferencias en la producción de los nectarios extraflorales debido a estos factores (Barton and Boege 2017). Se eligió al azar un individuo de cada par, y para evitar el acceso de las hormigas se le colocó una barrera plástica y una tira de goma espuma en la base del tallo principal. La planta no tratada de cada par fue utilizada como control. A las plantas se les colocó un tutor, también protegido por una barrera contra hormigas, que las mantuvo erguidas y aisladas de potenciales fuentes de hormigas (suelo y otras plantas).

La colección de datos comenzó cuando se registró por primera vez la presencia de hormigas y mariposas en una de las plantas del experimento, momento a partir del cual las plantas fueron visitadas semanalmente en nueve oportunidades (12/12/2011 al 13/2/2012) hasta que la baja disponibilidad de hojas comenzó a dificultar los conteos. Cada visita abarcó un período de 2-3 horas entre las 8:00 y las 13:00 h. En cada visita se eligieron al azar 10 hojas de cada planta de cada par. En cada hoja se contó el número de hormigas, de huevos y de larvas. Además, en cada visita se estimó el daño por herbivoría como el porcentaje de superficie de cada hoja que fue comido (redondeado al 5%). La frecuencia semanal de visitas garantizó que los huevos encontrados fueran el resultado de puestas recientes, con los cual se evitó el doble conteo de huevos (aunque no el de larvas). Debido a que el doble conteo del daño por herbivoría no pudo ser evitado, se tuvo en cuenta en los modelos estadísticos utilizados.

Todos los análisis se realizaron mediante modelos lineales mixtos o modelos lineales mixtos generalizados (MLM o MLMG, respectivamente) (Bolker et al. 2009). El uso de modelos mixtos fue necesario para considerar la falta de independencia de las plantas del mismo par y de las medidas repetidas en cada planta. Se realizó un análisis exploratorio para detectar valores extremos en las variables medidas (siguiendo a Zuur et al. 2013), en base al cual se eliminaron observaciones (i.e., hojas individuales) que tuvieron un número

de huevos mayor a 7 (una observación) o un número de hormigas mayor a 6 (cuatro observaciones). Para evaluar la efectividad del tratamiento de exclusión de hormigas se construyó un MLMG (ver M1 en Anexo 1) con el número de hormigas registrado por hoja como variable respuesta, y el tratamiento ("con" o "sin" hormigas) y el tiempo (día desde el inicio de las mediciones de campo) como factores fijos. Se incluyó en el modelo la interacción entre el tratamiento y el tiempo porque un análisis preliminar mostró una tendencia a que las diferencias en el número de hormigas entre plantas con y sin hormigas fueran mayores al principio que al final del experimento.

El número de huevos y larvas fueron analizados con MLMGs, con distribución del error del tipo Poisson (ver M2 y M3, respectivamente, en Anexo 1). Para analizar el daño foliar se utilizó un modelo lineal mixto (M4 en Anexo 1), con distribución normal del error, en el que se utilizó como variable respuesta el logaritmo del cociente entre el porcentaje de hoja no dañada y el porcentaje dañado (transformación "log-ratio") (Aitchison 1986). Para calcular el cociente, los valores de daño de 0 y 100% fueron reemplazados por 1 y 99%, respectivamente. Con esta transformación, la variable respuesta asume valor positivo si el daño es menor a 50%, negativo si es mayor a 50% y 0 si es exactamente 50%. Se prefirió esta transformación antes que el logaritmo del porcentaje de daño debido a que es una variable respuesta no limitada entre valores fijos y que mejoró la distribución de los residuos del modelo estadístico. En el modelo se incluyeron como factores fijos el tratamiento y el tiempo. Debido a que la efectividad del tratamiento de exclusión no fue de 100%, se incorporó en los modelos el logaritmo del número de hormigas como variable "offset" (i.e., se agregó con coeficiente 1 al predictor lineal del modelo). Un análisis preliminar mostró que la inclusión de esta variable determinaba que la interacción entre los factores Tratamiento y Tiempo resultara no significativa, lo que facilitaba la interpretación de los resultados. También se incluyó una ordenada al origen aleatoria para cada planta individual como un factor aleatorio anidado dentro de cada bloque. En los cuatro modelos se incluyó una ordenada al origen aleatoria para cada planta individual como un factor aleatorio anidado dentro de cada par de plantas (ver detalles en Anexo 1). La estimación de los parámetros del modelo

fue realizada por máxima verosimilitud en el análisis del número de hormigas (M1) y por cuasi-verosimilitud penalizada en el resto (M2, M3 y M4). Se utilizaron las funciones glmer (en el M1) del paquete lme4 (versión 1.1-12) y glmmPQL (M2, M3 y M4) del paquete MASS (versión 7.3-45) de R (R Development Core Team 2008; versión 3.3.3).

RESULTADOS

Durante las observaciones de campo se controlaron 2180 hojas, sobre las que se registraron 724 hormigas de 5 morfotipos correspondientes a 5 géneros diferentes,

Crematogaster (subf. Myrmicinae), *Brachymyrmex* (subf. Formicinae), *Solenopsis* subgen. *Diplorophthrum* (subf. Myrmicinae), *Paratrechina* (subf. Formicinae), y *Pseudomyrmex* (subf. Pseudomyrmicinae). Se observaron individuos alimentándose de los NEF de *P. caerulea*, aunque no se identificó a qué morfotipos pertenecían. Durante el experimento se contabilizaron además 660 huevos y 373 larvas de mariposa.

Efectividad del tratamiento de exclusión

El tratamiento de exclusión redujo significativamente (aunque no por completo)

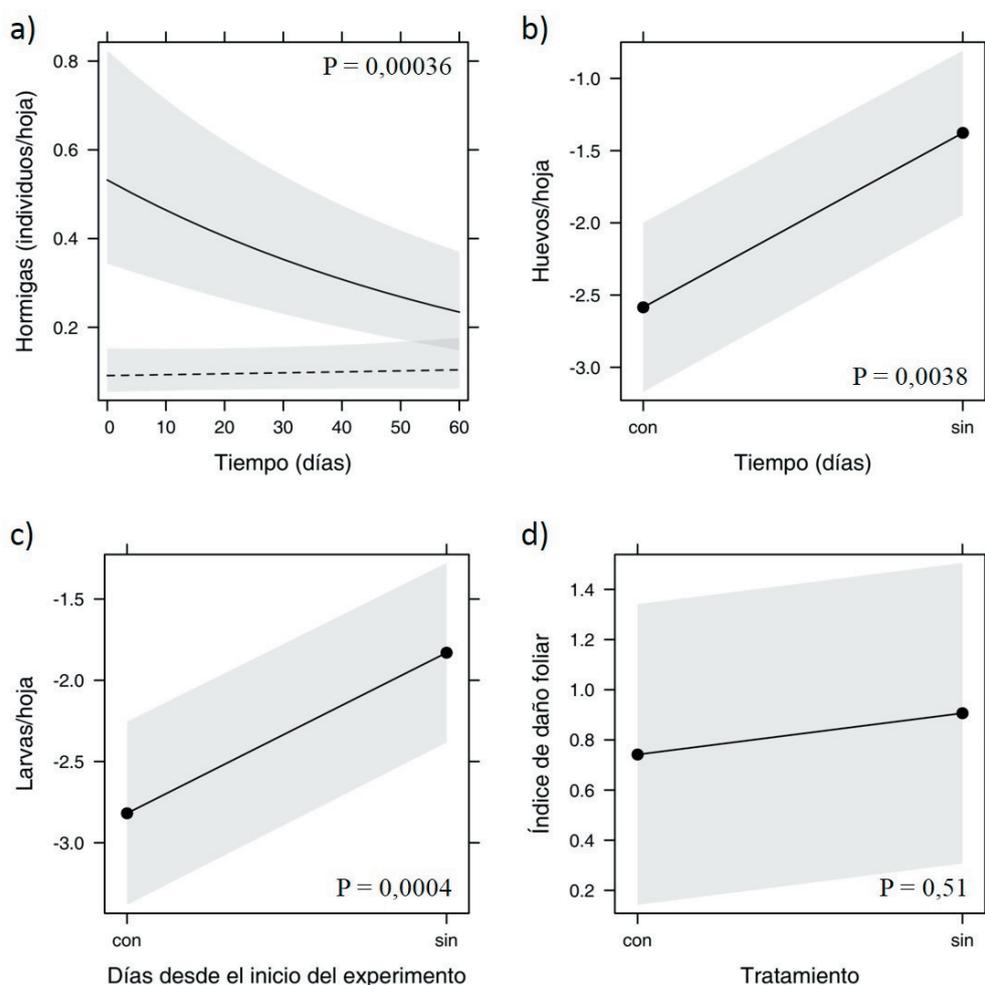


Figura 1. Efectos principales del tratamiento de exclusión de hormigas sobre el número de (a) hormigas, (b) huevos y (c) larvas de *Agraulis vanillae* y (d) el daño foliar, medidos en plantas de *Passiflora caerulea*. En (a), las líneas sólida y rayada corresponden a los tratamientos con y sin hormigas, respectivamente. Se incluye el valor de significancia del efecto de la variable Tratamiento en cada modelo estadístico, excepto en (a), donde se indica el valor correspondiente al término de interacción Tratamiento x Tiempo.

Figure 1. Main effects of ant exclusion treatment on the number of (a) ants, (b) eggs and (c) larvae of *Agraulis vanillae* and (d) leaf damage measured on *Passiflora caerulea* plants. In (a), the solid and dashed lines correspond to the treatments with and without ants, respectively. The value of the significance of the effect of the variable Treatment in each statistical model is included, except in (a), where the value corresponding to the interaction term Treatment x Time is indicated.

el número de hormigas registrado sobre las plantas (media por hoja \pm SE, con: 0.49 \pm 0.02, sin: 0.14 \pm 0.01; prueba de Mann-Whitney, $W=708600$, $P<<0,0001$). El análisis en el contexto de un MLGM (ver detalles del M1 en el Anexo) reveló que hubo una interacción significativa entre las variables Tratamiento y Tiempo ($Z=3.56$, $P=0.00036$) (Figura 1a) que se manifestó en que la diferencia entre plantas con y sin hormigas tendió a ser mayor al comienzo del experimento y fue disminuyendo con el paso de los días debido a una caída posiblemente estacional en el número de hormigas en las plantas sin restricciones de acceso.

Efecto top-down de las hormigas sobre Agraulis vanillae y su daño

Los resultados se correspondieron con las predicciones 1 y 2, y no con la predicción 3. Primero, en plantas donde se restringió el acceso de hormigas se registró un número de huevos (predicción 1) significativamente mayor que en las plantas con hormigas (media por hoja \pm SE, con: 0.24 \pm 0.02, sin: 0.34 \pm 0.02; coeficiente de regresión=1.20 \pm 0.34, $t=3.51$, $P=0.0038$) (Figura 1b; ver detalles modelo M2 del Anexo). Segundo, en plantas donde se restringió el acceso de hormigas se registró un número de larvas (predicción 2) significativamente mayor que en las plantas con hormigas (media por hoja \pm SE, con: 0.15 \pm 0.01, sin: 0.19 \pm 0.01; coeficiente de regresión=0.98 \pm 0.20, $t=4.76$, $P=0.0004$) (Figura 1c; ver detalles modelo M3 del Anexo). Además, se encontró una correlación positiva leve, pero significativa, entre el número de huevos y el número de larvas encontrados por hoja (coeficiente de correlación Pearson=0.09, $t=4.43$, $P<0.0001$). Finalmente, en plantas donde se restringió el acceso de hormigas, el daño foliar producido por herbivoría (predicción 3) no fue significativamente distinto al registrado en plantas con hormigas (media por hoja \pm SE, con: 37.19 \pm 1.1, sin: 40.01 \pm 1.14; coeficiente de regresión=0.16 \pm 0.24, $t=0.66$, $P=0.51$) (Figura 1d; ver detalles modelo M4 del Anexo). A lo largo del experimento se observó un aumento significativo (aunque leve) del daño por herbivoría con el paso del tiempo (coeficiente de regresión=0.007 \pm 0.002, $t=2.83$, $P=0.004$; ver detalles modelo M4 del Anexo).

DISCUSIÓN

Este trabajo exploró la ocurrencia de interacciones tripartitas planta-herbívoro-

hormiga en una reserva ecológica urbana y estudió, mediante un experimento de exclusión clásico, el efecto de la presencia de hormigas sobre la abundancia de un herbívoro especialista y el daño foliar causado por el mismo. El sistema conformado por *Passiflora* y sus herbívoros especialistas, lepidópteros de la tribu Heliconiini, fue estudiado en numerosas ocasiones (Rico-Gray and Oliveira 2007), pero este estudio es el primero en hacerlo en un ambiente urbano. Se encontró que la presencia de hormigas redujo el número de huevos y de larvas de *A. vanillae*, pero no el daño foliar producido por sus larvas. Estos resultados indican, para el Parque Natural Municipal Ribera Norte, la existencia de una asociación facultativa entre *P. caerulea* y cinco morfotipos de hormigas pertenecientes a géneros (*Brachymyrmex*, *Crematogaster*, *Paratrechina*, *Pseudomyrmex* y *Solenopsis*), cuyo comportamiento de defensa contra herbívoros fue previamente documentado en otros sistemas (Fernández 2003; Rico-Gray and Oliveira 2007).

Un gran número de trabajos documentan la ocurrencia de interacciones agresivas entre hormigas y distintos estadios de desarrollo de mariposas (i.e., huevo, larva y, posiblemente, pupa) (Turner 1981; Smiley 1985, 1986; Freitas and Oliveira 1992, 1996b). En este estudio, el experimento de exclusión mostró que, como se esperaba, las hormigas funcionaron como un agente de control efectivo de la abundancia del herbívoro, ya que su presencia restringió el número de huevos y larvas registrado en las plantas. En las plantas con hormigas se observó una caída promedio de ~30% en el número de huevos y ~20% en el número de larvas respecto de plantas sin hormigas. Esta diferencia podría deberse a al menos tres factores. Primero, la efectividad de las hormigas como agente de control del herbívoro pudo ser mayor en el estadio de huevo que en estadios posteriores; en particular, el efecto de las hormigas puede resultar limitado cuando las larvas alcanzan un tamaño crítico a partir del cual su defensa mecánica (tegumento grueso) o química (compuestos derivados de la planta hospedera) contra las hormigas resulta más efectiva (Giusto et al. 2001). Segundo, en los distintos estadios pudieron existir mecanismos de control de *A. vanillae* que fueron adicionales al ejercido por las hormigas (e.g., otros depredadores) (Singer et al. 2017). Por último, dada la importancia de la abundancia de hormigas en la magnitud del efecto sobre el herbívoro (e.g., Giusto et al. 2001), no puede descartarse que el menor

efecto sobre las larvas se deba, al menos en parte, a la menor abundancia de hormigas hacia el fin del experimento.

Un resultado destacable es la reducción que se observó a lo largo de la temporada en el número de hormigas registrado sobre las plantas de *Passiflora*. Esto puede responder a múltiples factores, tanto bióticos como abióticos (Rico-Gray and Oliveira 2007). Una posibilidad es que las hormigas hayan modificado su comportamiento debido, por ejemplo, a cambios en el suministro de néctar por parte de la planta por una menor producción de los nectararios. También es posible que haya ocurrido una reducción local en las poblaciones de hormigas debido a cambios estacionales o a efectos del ambiente circundante (e.g., inundaciones temporarias que ocurrieron hacia el final de experimento por crecidas del Río de la Plata). En estudios futuros sería de utilidad contar con una estimación independiente de la abundancia local de hormigas (e.g., con trampas de caída) para comprender mejor las causas de la tendencia estacional registrada, así como también incluir estudios comportamentales para evaluar el grado de agresividad o “valor protector” de cada especie de hormiga (o de aquellas más abundantes en este sistema) en el sistema *Agraulis-Passiflora* estudiado. Estos ensayos (e.g., experimentos de reclutamiento de hormigas frente a daño artificial o natural, o tasa de ataque a herbívoros inmovilizados) permitirían discernir la eficiencia de protección entre pares de especies de hormigas y estadio de herbívoros, así como explicar mejor los patrones de daño. De forma alternativa, para comprender dichos patrones estacionales puede ser de utilidad evaluar aspectos como la cantidad o calidad de las secreciones del néctar extrafloral (Sobrinho et al. 2002), la identidad, la densidad o la agresividad de las hormigas presentes en las plantas (Mody and Linsenmair 2004).

Aunque en este estudio no se realizó una estimación de las abundancias relativas ni del comportamiento de cada tipo de hormiga, es posible que todos los morfotipos registrados hayan contribuido en alguna medida a la reducción observada en el número de huevos y larvas de *A. vanillae*. Si bien se propuso que en los mutualismos de defensa planta-hormiga, la presencia de múltiples especies de hormiga que difieren entre sí en su efectividad como defensoras puede generar en la planta hospedera una reducción neta en la defensa contra herbívoros, en comparación con la que

obtendría por interactuar en forma exclusiva con una sola especie (Bronstein et al. 2003), si existió tal efecto en nuestro estudio, no fue evidente (ver también Miller 2007). Una limitación de los datos obtenidos es que no permiten determinar si las disminuciones de huevos y larvas se deben a una modificación del comportamiento de oviposición de los adultos de *A. vanillae* (e.g., Freitas and Oliveira 1996a) o a la destrucción activa de huevos (e.g., Robertson 1988; López and Potter 2000) y larvas (e.g., Oliveira et al. 2012) por parte de las hormigas.

Con respecto al daño por herbivoría, la ausencia de un efecto protector de las hormigas puede deberse al menos a cuatro causas. Primero, la reducción en el número de larvas puede no haber sido suficiente para generar una disminución significativa en el daño foliar. Además, como la intensidad de daño foliar depende del estadio larval (i.e., orugas más grandes comen mucho más en comparación con las orugas de los primeros instares), considerar el número de larvas no es suficiente para explicar las diferencias entre tratamientos. Segundo, es probable que el daño observado en las plantas de *P. caerulea* haya sido el resultado de la acción de otros herbívoros (además de las larvas de *A. vanillae*) cuyo efecto no pudo ser controlado en el experimento, lo que podría haber escondido posibles diferencias entre tratamientos. Las observaciones de campo realizadas en forma no sistemática durante el estudio sugieren que buena parte del daño foliar fue causado por coleópteros del género *Cacoscelis* (Chrysomelidae), que utilizan las plantas de *P. caerulea* como alimento de los adultos, lugar de cortejo, de limpieza y de oviposición (ésta última se produce en el suelo, cerca del tallo principal) (Amela García and Hoc 1998). Estos herbívoros serían capaces de alimentarse de la planta hospedera a pesar de la presencia de las hormigas. Amela García y Hoc (1998) observaron que individuos de *Cacoscelis* sp. presentes en un individuo de *P. caerulea* saltaban a la vegetación vecina o al suelo al ser disturbados por abejorros y luego regresaban a la planta. Esta es una de las estrategias de defensa comunes utilizadas por distintos grupo de insectos herbívoros para tolerar el ataque de hormigas y otros artrópodos (Heads and Lawton 1985). Tercero, la diferencia esperable entre tratamientos puede haber sido reducida por la ocurrencia de crecimiento compensatorio en respuesta a la herbivoría (Crawley 1987). Si bien es un fenómeno del que

no hay evidencia para *Passiflora*, la muy leve acumulación del daño por herbivoría a lo largo del ensayo de campo (Modelo M4 del Anexo) apoya esta explicación. Por último, la variación en las tasas de daño entre individuos puede deberse no sólo a defensas indirectas (NEF) sino también directas. El género *Passiflora* posee múltiples mecanismos adicionales de defensa contra herbívoros (e.g., glucósidos cianogénicos, alcaloides, tricomas, escape temporal y mimetismo de huevos) (Gilbert 1982; Spencer 1988), los cuales no sólo pueden influenciar de forma directa las tasas de daño, sino también indirectamente al competir por recursos con los NEF de las plantas. La acción simultánea de estos múltiples mecanismos podría estar moderando las tasas de daño por herbivoría registrados en plantas de ambos tratamientos (Agrawal and Fishbein 2006; Carmona et al. 2011).

Algunas revisiones recientes identificaron que en mutualismos planta-hormiga, el efecto protector ante la herbivoría suele ser mayor en ambientes tropicales que en ambientes templados, en plantas con domacios, respecto de plantas que nos los poseen, y en comunidades de hormigas de mayor riqueza específica (Chamberlain and Holland 2009). En este contexto, la falta de evidencia de que las hormigas ejerzan un efecto protector en *P. caerulea* no resulta sorprendente si se considera que este estudio se realizó en una planta sin domacios, en una zona templada y en un ambiente relativamente pobre en especies de hormigas (por la latitud y, en particular, por tratarse de una pequeña reserva urbana). Además, el resultado neto de estas interacciones suele ser muy variable y dependiente del contexto, y si bien suelen resultar positivas para las plantas involucradas, en ocasiones pueden tener un resultado neutro (Chamberlain and Holland 2009), aun cuando las hormigas hayan afectado negativamente a los herbívoros, como ocurrió en este estudio.

Este estudio demostró que *A. vanillae* y varias especies de hormigas interactúan con *P. caerulea* en el PNMRN. Si bien los resultados no apoyan la hipótesis planteada de que estas hormigas regulan la herbivoría

que sufre la planta por las larvas de *A. vanillae*, es destacable que, a pesar de tratarse de una reserva ecológica de pequeño tamaño, se encontraron las interacciones ecológicas que se esperaba encontrar (planta-hormiga y planta-mariposa). Los resultados ponen en evidencia la importancia de *P. caerulea* en los ambientes costeros de la ribera platense, ya que, por un lado, es un recurso alimentario clave para las larvas de *A. vanillae* (que se alimentan sólo de esta planta) y, por el otro, es una fuente fundamental de alimento azucarado tanto para las hormigas como para los demás insectos que se alimentan del néctar extrafloral. Además de las especies encontradas que conforman el sistema bajo estudio, también se observó una gran cantidad de interacciones con otros insectos (coleópteros, hemípteros, himenópteros, etc.) que se alimentaban de alguna parte de la planta. Esta información sugiere que la presencia de *P. caerulea* en el ámbito de la reserva es importante como fuente de alimento para un grupo significativo de insectos, lo que alienta a fomentar acciones tendientes a su conservación en este ambiente. Más allá del área protegida considerada, este estudio abre el interrogante sobre la ocurrencia y el resultado de estas interacciones en reservas urbanas de la región (e.g., la Reserva Otamendi o la Reserva Ecológica Costanera Sur), las cuales, debido a su mayor tamaño, probablemente posean una fauna de hormigas más diversa y abundante. Las especies que coexisten e interactúan entre sí en estas "islas de biodiversidad" constituyen un sistema ecológico interesantísimo y del que aún se conoce muy poco.

AGRADECIMIENTOS. Antonio López-Carretero y tres revisores anónimos realizaron valiosos comentarios sobre versiones previas de este manuscrito. Drew Tyre, Serge-Étienne Parent, Thierry Onkelinx y Norberto Bartoloni dieron consejos útiles sobre el análisis de los datos. Agradecemos a la Dirección de Ecología y Conservación de la Biodiversidad del Municipio de San Isidro por otorgar el permiso para realizar el presente estudio en el PNMRN, y a Norberto H. Montaldo y al cuerpo de guardaparques de la reserva por su apoyo logístico. Este trabajo fue financiado por un subsidio UBACyT otorgado a MD.

REFERENCIAS

- Agrawal, A. A., and Fishbein, M. (2006). Plant defense syndromes. *Ecology* 87(7 Suppl):S132-4.
- Aitchison, J. 1986. The statistical analysis of compositional data. Chapman and Hall, London.
- Amela García, M. T., and P. S. Hoc. 1998. Aspectos de la biología floral y el sistema reproductivo de *Passiflora mooreana* (Passifloraceae). *Darwiniana* 35:1-4.

- Barton, K. E. and, K. Boege. 2017. Future directions in the ontogeny of plant defence: understanding the evolutionary causes and consequences. *Ecology Letters* **20**:403-411.
- Beattie, A. J., and L. Hughes. 2002. Ant-plant interactions. Pp. 211-235 in C. M. Herrera and O. Pellmyr (eds.). *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*. Blackwell Science Ltd Oxford, UK.
- Benson, W. W., K. S. Brown, and L. E. Gilbert. 1975. Coevolution of Plants and Herbivores: Passion Flower Butterflies. *Evolution* **29**:659-680.
- Bertolini, M. P., and N. Deginani. 1995. Relevamiento florístico del Refugio Natural Educativo de la Ribera Norte. San Isidro, Bs. As.
- Bolker, B. M., M. E. Brooks, C. J. Clark, S. W. Geange, J. R. Poulsen, M. H. H. Stevens, et al. 2009. Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **24**:127-135.
- Bronstein, J. L. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Trends in Ecology and Evolution* **9**:214-217.
- Bronstein, J. L., W. G. Wilson, and W. F. Morris. 2003. Ecological dynamics of mutualist/antagonist communities. *Am Nat* **162**:S24-39.
- Bruna, E. M., D. M. Lapola, and H. L. Vasconcelos. 2004. Interspecific variation in the defensive responses of obligate plant-ants: experimental tests and consequences for herbivory. *Oecologia* **138**:558-565.
- Canals, G. R. 2000. Mariposas Bonaerenses. Literature of Latin America, Buenos Aires (Argentina).
- Carmona, D., M. J. Lajeunesse, and M. T. J. Johnson. 2011. Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology* **25**:358-367.
- Cordo, H., G. Logarzo, K. Braun, O. Di Iorio, and (directores) (2004). *Catálogo de Insectos Fitófagos de la Argentina*. Sociedad Entomológica Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- Crawley, M. J. 1987. Benevolent herbivores? *Trends in Ecology and Evolution* **2**:167-168.
- Chamberlain, S. A., and J. N. Holland. 2009. Quantitative synthesis of context dependency in ant-plant protection mutualisms. *Ecology* **90**:2384-2392.
- Chamberlain, S. A., J. R. Kilpatrick, and J. N. Holland. 2010. Do extrafloral nectar resources, species abundances, and body sizes contribute to the structure of ant-plant mutualistic networks? *Oecologia* **164**:741-750.
- Deginani, N. B. 2001. Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana* **39**:43-129.
- del Val, E., R. and Dirzo. 2004. Mirmecofilia: las plantas con ejército propio. *Interciencia* **29**:673-679.
- Fernández, F. 2003. *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia.
- Freitas, A. V. L., and P. S. Oliveira. 1992. Biology and behavior of *Eunica bechina* (Lepidoptera: Nymphalidae) with special reference to larval defense against ant predation. *Journal of Research on the Lepidoptera* **31**:1-11.
- Freitas, A. V. L., and P. S. Oliveira. 1996a. Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *Journal of Animal Ecology* **65**:205-210.
- Freitas, A. V. L., and P. S. Oliveira. 1996b. Ants as selective agents on herbivore biology: effects on the behaviour of a non-myrmecophilous butterfly. *Journal of Animal Ecology* **65**:205-210.
- Fuentes, M. B., F. C. Cuezco, and O. R. Di Iorio. 1998. Ants (Hymenoptera: Formicidae) from the Natural Reserve of Otamendi, Buenos Aires, Argentina. *Giornale Italiano di Entomologia* **9**:97-98.
- Gaston, J. K., Z. G. Davies, and J. L. Edmondson. 2010. Urban environments and ecosystem functions. In K. J. Gaston (ed.) *Urban Ecology*. Cambridge University Press Cambridge.
- Gilbert, L. E. 1982. The coevolution of a butterfly and a vine. *Scientific American* **247**:110-121.
- Giusto, B., M. -C. Anstett, E. Dounias, and D. B. McKey. 2001. Variation in the effectiveness of biotic defence: the case of an opportunistic ant-plant protection mutualism. *Oecologia* **129**:367-375.
- Heads, P. A., J. H. and Lawton. 1985. Bracken, ants and extrafloral nectaries. III. How insect herbivores avoid predation. *Ecological Entomology* **10**:29-42.
- Heil, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist* **178**:41-61.
- Janzen, D. H. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution* **20**:249-275.
- Kalesnik, F., M. Cagnoni, P. Bertolini, R. Quintana, N. Madanes, and A. Malvárez. 2005. La vegetación del refugio educativo de la Ribera Norte, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Invasión de especies exóticas*. INSUGEO, Miscelánea **14**:139-150.
- Koptur, S. 1991. Extrafloral nectaries of herbs and trees: modelling the interaction with ants and parasitoids. Pp. 213-229 in D. F. Cutler C. and Huxley (eds.). *Ant-Plant Interactions*. Oxford University Press.
- Kusnezov, N. 1964. Zoogeografía de las hormigas en Sudamérica. *Acta Zool. Lilloana* **19**:25-186.
- Kusnezov, N. 1978. Hormigas argentinas: clave para su identificación. *Miscelánea*. Instituto Miguel Lillo **61**:1-147.
- López, R., and D. A. Potter. 2000. Ant Predation on Eggs and Larvae of the Black Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Japanese Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) in Turfgrass. *Environmental Entomology* **29**:116-125.
- Mayer, V. E., M. E. Frederickson, D. McKey, and R. Blatrix. 2014. Current issues in the evolutionary ecology of ant-plant symbioses. *New Phytologist* **202**:749-764.
- Miller, T. E. X. 2007. Does having multiple partners weaken the benefits of facultative mutualism? A test with cacti and cactus-tending ants. *Oikos* **116**:500-512.
- Minotti, P., P. Kandus, and S. Valli. 1988. Caracterización ecológica del Bajo Delta Bonaerense. Pp. 145 in J. Adámoli

- and A. I. Malvárez (eds.). Informe Subsidio UBACyT No 135. Condicionantes ambientales y bases ecológicas para la formulación de alternativas productivas y ocupacionales en la región del Delta. Universidad de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina.
- Mody, K., and E. Linsenmair. 2004. Plant-attracted ants affect arthropod community structure but not necessarily herbivory. *Ecological Entomology* 29:217-225.
- Murase, K., T. Itioka, M. Nombra, and S. Yamane. 2003. Intraspecific variation in the status of ant symbiosis on a myrmecophyte *Macaranga bancana*, between primary and secondary forests in Borneo. *Poplar Ecology* 45:221-226.
- Nuñez Bustos, E. 2010. Mariposas de la Ciudad de Buenos Aires y alrededores. Vázquez Mazzini Editores, Ciudad de Buenos Aires.
- Oliveira, R., L. Almeida, D. Souza, C. Munhae, O. Bueno, and M. Morini. 2012. Ant diversity (Hymenoptera: Formicidae) and predation by ants on the different stages of the sugarcane borer life cycle *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *EJE* 109:381-387.
- Pastrana, J. A. 2004. Los lepidópteros argentinos. Plantas hospedadoras y otros sustratos alimenticios. Sociedad Entomológica Argentina, Buenos Aires.
- R Development Core Team. 2008. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rico-Gray, V., and P. S. Oliveira. 2007. The ecology and evolution of ant-plant interactions. Chicago University Press, Chicago.
- Robertson, H. G. 1988. Spatial and temporal patterns of predation by ants on eggs of *Cactoblastis cactorum*. *Ecological Entomology* 13:207-214.
- Rothschild, M. 1984. Aide memoire mimicry. *Ecological Entomology* 9:311-319.
- Sachs, J. L., and E. L. Simms. 2006. Pathways to mutualism breakdown. *Trends in Ecology and Evolution* 21:585-592.
- Schneiberg De Castro Lima, I. 2017. A influência da estrutura da paisagem, conectividade da paisagem e da qualidade do fragmento florestal sobre as propriedades das redes de aves frugívoras em ambiente urbano. Universidade Federal do Paraná Curitiba.
- Seigler, D. S., K. C. Spencer, W. S. Statler, E. E. Conn, and J. E. Dunn. 1982. Tetraphyllin B and epitetraphyllin B sulphates: Novel cyanogenic glucosides from *Passiflora caerulea* and *P. alata-caerulea*. *Phytochemistry* 21:2277-2285.
- Servicio Meteorológico Nacional. 1992. Estadísticas Climatológicas N° 37 (1981-1990), Buenos Aires, Argentina.
- Silva, D. S. D., R. Dell'Erba, L. A. Kaminski, and G. R. P. Moreira. 2006. Morfologia externa dos estágios imaturos de heliconíneos neotropicais: V. *Agraulis vanillae maculosa* (Lepidoptera, Nymphalidae, Heliconiinae). *Iheringia. Série Zoologia* 96:219-228.
- Singer, M. S., R. E. Clark, I. H. Lichter-Marck, E. R. Johnson, and K. A. Mooney. 2017. Predatory birds and ants partition caterpillar prey by body size and diet breadth. *J Anim Ecol* 86:1363-1371.
- Smiley, J. T. 1985. Heliconius caterpillar mortality during establishment on plants with and without attending ants. *Ecology* 66:845-849.
- Smiley, J. T. 1986. Ant constancy at *Passiflora* extrafloral nectaries: effects on caterpillar survival. *Ecology* 67:516-521.
- Sobrinho, T. G., J. H. Schoereder, L. L. Rodrigues, and R. G. Collevatti. 2002. Ant visitation (Hymenoptera: Formicidae) to extrafloral nectaries increases seed set and seed viability in the tropical weed *Triumfetta semitriloba*. *Sociobiology* 39:353-372.
- Spencer, K. C. 1988. Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora*-*Heliconius* interaction. Pp. 167-240 in K. C. Spencer (ed.). *Chemical mediation of coevolution*. Academic Press, San Diego.
- Turner, J. R. G. 1981. Adaptation and Evolution in *Heliconius*: A Defense of NeoDarwinism. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12:99-121.
- Zuur, A. F., J. M. Hilbe, and E. N. Ieno. 2013. *Beginner's Guide to GLM and GLMM with R*. Highland Statistics Ltd, Newburgh, UK.