|  |  |
| --- | --- |
| Further Investigation of Passiflora-feeding Flea Beetles at La Selva, August – December 2015John Smiley, June 13, 2015IntroductionAs written in my MINAE Progress Report dated March 2014, I was able to compare the ecology of flea beetles to the ecology of Heliconius butterflies, both of which are found on Passiflora vines at La Selva. I have created a web site  <http://johnterahsmiley.com/heliconius-passiflora-flea%20beetle/FB%20summary%202014/summary%202014.html> to compile results and analysis of my study to date. This far I have been able to identify and describe the larval stages of six flea beetle species, including Parchicola DF2, Parchicola “yellow tibia”, Ptocadica “red”, Ptocadica bifasciata, Pedilia “red” and Disonycha quinquelineata. The larvae of the remaining species Monomacra violácea, M. chontalensis, Parchicola “black tibia” and Ptocadica “yellow” have not yet been observed and described. M. violácea is particularly important since it is a very common species and overlaps with all the other species.To discover these larvae I plan to employ methods that were successful with the other flea beetle species (see below). For M. violácea adults I plan to use P. lobata as host plant. My field observations suggest that the beetles can reproduce on this plant.I also plan to continue measurements of cyanogenesis in Heliconius, flea beetles and Passiflora vines, to delinate the tremendous variation I have found to date. This variation is unsuspected in the literature and my field-collected measurements will open up a whole new area of investigation in Passiflora-herbivore ecology.I also plan to continue surveying Passiflora for flea beetles. This will help clarify the relationships among the species and perhaps lead to the discovery of new species.I will need shadehouse #2 at La Selva for this work, which already has a set of potted Passiflora vines of each species. I will also need space in the analytical lab and a bench in the ambient lab for feeding trials and measurements of cyanogensis. I will also use the Passiflora garden as a source of leaves, larvae and adult flea beetles.My proposed plan is to arrive at La Selva August 6, 2015 and stay for 4 months, leaving December 9.  Kim plans to come down September 10 to join me and stay until December 9, when we will fly home together to California.  My colleague Carlos Garcia-Robledo, at the Institute of Ecology, Xalapa, Veracruz, Mexico and I have assembled a reference DNA barcode library containing sequences from all of the Passiflora-feeding Alticini species from La Selva. These results have confirmed the diversity of 10 species of Passiflora-feeding flea beetles at La Selva, the same 10 species that were present in 1976. We may extend the analysis to new specimens collected during this next phase of our investigation, using the same or better techniques. This work is permitted by a CONAGEBIO permit (R-006, expediente 188) from the Costa Rican government.Objectives:1. Collect approximately 250 adult and larvae flea beetles belonging to 10-15 species, and bring them into the laboratory for analysis and preservation. The known species are: *Disonycha quinquelineata, Monomacra chontalensis, M. violacea, “Black-tibia” Parchicola, “DF-2” Parchicola, “Yellow-tibia” Parchicola, Ptocadica bifasciata, “Red” Ptocadica, and “Yellow” Ptocadica*. I may discover new species of Passiflora-feeding flea beetle and will collect those for laboratory analysis also. The life-histories of most of these beetles are unknown to science.
2. In the laboratory shadehouse I will confine adult flea beetles in mesh cages with potted Passiflora vines. I will then observe their behavior and examine the plants for flea beetle eggs and larvae. When found I will photograph the aggs, larvae and pupae for eventual publication, as these life stages have never been observed for these species.
3. I plan to test feeding preferences of flea beetle adults and larvae by confinig them in containers with leaves (or roots and stems, depending on the species) of different *Passiflora* species.
4. I will also make preserved specimens of the flea beetles for further analysis. This will include preservation in Karnovsky’s solution for eventual electron microscope imaging, dried whole specimens on points and pins, dried whole specimens unmounted, and preservation in 95% ethanol for future genetic analysis. These specimens will make the beetles accessible for future researchers who wish to explore this system.
5. Survey cyanogenic glycoside content in Passiflora vines in order to determine the sources of variation. Pay particular attention to the three most variable species, *Passiflora auriculata, P. biflora and P. ambigua*.
6. Create a searchable database of the cyanogenesis results, to be used by future investigators.
7. Record all field flea beetle sightings, including location, Passiflora species, presence of ants, and flea beetle species. Add this data to the Flea beetle x Passiflora matrix, further dilineating the relationship.
8. Create and manage a web site presenting selected information about the findings, open to all users.
9. Publish species’ descriptions for undiscribed species, in collaboration with Davis Furth of the United States National Museum. The only published information about this system may be found in a very preliminary form in Smiley (1982).

1. Add to the voucher collection of pinned and preserved specimens kept at La Selva and eventually destined for the Costa Rican National Museum.
2. Educate the public about the value of insect and plant diversity by participating in the annual Feria Ambiental at La Selva, and by meeting with La Selva visitors at other times.

Methods1. **The flea beetle survey** at La Selva began in 1975, while sampling Passiflora for Heliconius eggs and larvae, which culminated in 2012- 2015 with a matrix of well over 1000 individuals, their host plants, and the presence/absence of attending ants. All months of the year were sampled except May-July. Flea beetles were sampled by examining individual Passiflora vines for characteristic feeding damage, and, if damage was seen, searching the plant for flea beetles. Beetles often hide under leaves and occasionally on adjacent leaves 5-10 centimeters from the host plant. Passiflora vines were located by walking trails at the La Selva Biological Station. Trails traverse primary forest including light gaps, forest edge where trees meet disturbed areas, and second growth areas where land has been cleared but is now growing back. The latter includes the successional plots, experimental parcels where the land is regularly cleared on a five year rotation. The La Selva property includes 14 species of Passiflora, 12 of which grow in the lower elevations where JS could readily sample them for butterflies and flea beetles. Adults were counted multiple times on a given plant over a 2-3 month period, but only the maximum count for each species was recorded so as to avoid counting the same beetles twice.
2. Adult beetles on plants will be captured using two ounce polypropylene condiment cups with snap-on lids. Being careful not to touch or shake the plant, the open cup is positioned over the beetle. The lid is then positioned opposite the cup, under the leaf. The leaf (and beetle) are trapped by gently bringing the lid and cup together. When contact is made, the beetle hops into the cup and the cup plus opposing lid are gently slid off the leaf leaving the trapped beetle. Larval beetles are captured by removing their substrate leaf and placing the leaf in a cup. Cups with beetles are brought into the laboratory at La Selva.
3. Field-collected beetles are either killed by freezing or used in feeding experiments. Killed beetles are either mounted on points and placed in a pinned insect collection, put in 95% ethanol in microcentrifuge tubes for genetic analysis, or preserved in Karnovsky fixative for electron microscope analysis. The pinned insects are then divided into a Costa Rican collection curated by the Costa Rican National Museum, and a research voucher collection for the United States National Museum. Live beetles are handled by cooling them in a refrgerator or by anaesthetizing them with carbon dioxide. Permitting will include the present research/collecting permit, a specimen export permit, and an existing “CONAGEBIO” permit (R-006-2014-OT-CONAGEBIO) for conducting genetic analysis.
4. I will observe and measure the ability of flea beetle larvae and adults to consume alternate host plants within Passiflora. Larvae and adults are tested by placing them singly in a "Glad" brand plastic box approximately 15x20cm x 10 cm deep. Boxes are modified with a 7mm diameter hole in the side, suitable for inserting a 6mm outside diameter tube. When beetles need to be handled I will connect the tube to a supply of CO2 and bleed the gas into the plastic box until the beetles stop moving. To do this I use a large party balloon filled from a laboratory CO2 tank, fitted with a valve. Plant cuttings are trimmed to fit in the box and the stems inserted into small water-filled vials with cotton plugs. Feeding is observed daily and leaf area eaten is recorded.
5. Except for Pedilia "red", immature stages are difficult to find. Ptocadica larvae are seen occasionally on P. auriculata and P. biflora (Pt. bifasciata) and on P. lobata (Pt. "red"). Pedilia is brought into the lab for feeding trials. Pt. "red" larvae are obtained by placing the adult Pt. 'red" on a P. lobata plant in the shadehouse, and waiting until eggs are laid and larvae emerged. Egg laying and observation of larvae are also accomplished by placing potted plants in collapsible "Bioquip" cages 60x60cm x 90cm tall. Two to ten flea beetle adults were released in each cage. Cages were checked every 2-3 days for mating behavior, egg placement, larvae and new adults. When eggs or larvae were seen the potted plant was removed for examination.
6. Feeding trials and larval rearing cages will be kept in the La Selva "ambient" lab, open to outdoor air circulation and offering temperature and humidity conditions similar to ambient values. Cages with potted plants are maintained in a "shade" house open to the rain and partially shaded to provide good conditions for growth of potted plants.
7. **Genetic Analysis.** I will place a representative sample of eight of the flea beetle species in alcohol-filled microcentrifuge tubes, including saving 13-23 adults or larvae of each species. For the rarer species this will not be possible, for example Ptocadica "yellow" is represented only twice and Monomacra chontalensis and Disonycha quinquelineata not at all. Tubes are kept refrigerated at -27 degrees C, except during transport and sample preparation. Eventually, flea beetle legs or other small body parts (larvae) will be placed in 96-well plates, in buffer solution, and plates were mailed to Carlos Garcia-Robledo at the United States National Museum. Carlos will then process the samples along with other Neotropical Chrysomelidae, using genetic "barcoding" procedures outlined in Garcia-Robledo (2013). The procedures include sequencing Cytochrome Oxidase (CO I) region of the mitochondrial genome of each specimen. We then create a table of similarities between all individuals, and use Geneious Pro (v. 5.6.5) to generate a neighbor-joining tree with bootstrap statistics (100 replicates) to evaluate species differences.
8. Using a portable cyanide gas meter developed for emergency personnel entering hazardous situations, I developed a method for measuring parts per million (ppm) of HCN gas produced by crushing plant and animal tissues. This procedure employs a 150 ml plastic container to hold and concentrate the HCN released from the sample, and an air pump to deliver the gas from the cup to the meter. The technique is moderately sensitive, enabling quantification of just a few hundredths of a micromole of HCN gas per gram of tissue and is reasonably precise, yielding values with less than 10% variation around the mean. Unfortunately, about half of the HCN is lost during measurement, so that the measured parts per million are about 50% of the true absolute amount. The percentage loss is consistent, however, and as I discovered, is insignificant in comparison with the actual variability in the plants. To make more accurate measurements, I also developed a "closed system" procedure. This technique gives readings without gas losses that are as accurate as the instrument allows. However, given the equipment available, this procedure is much less sensitive and much more time-consuming than the plastic cup technique. See the on-line <http://johnterahsmiley.com/heliconius-passiflora-flea%20beetle/FB%20summary%202014/Appendix%201.html> for more details on measurement technique.

BibliographyW. W. Benson, K. S. Brown Jr., and L. E. Gilbert, “Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies,” Evolution, vol. 29, no. 4, pp. 659–680, 1975. Brown, Keith S. 1981. The biology of Heliconius and related genera. Ann. Rev. Entomology 26: 427-56 Duckett, Catherine N. 2003. A new species of flea beetle, genus Pedilia Clark (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae), from Osa Pennisula, Costa Rica. Zootaxa 158: 1-8 Duckett, Catherine N. and Sandra Moya. 1999. A new species of Ptocadica (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticini) from Costa Rica and Panama. The Coleopterists Bulletin 53 (4); 311-319 Engler, Helene S., Kevin C. Spencer, Lawrence E. Gilbert 2008 Preventing Cyanide Release from Leaves Nature 406:144-45 Engler-Chaouat, Helene S. and Lawrence E. Gilbert. 2006. De novo Synthesis vs. Sequestration: Negatively Correlated Metabolic Traits and the Evolution of Host Plant Specialization in Cyanogenic Butterflies. J Chem Ecol (2007) 33:25–42 Furth, D. G., J. T. Longino, & M. Paniagua. 2003. Survey and quantitative assessment of flea beetle diversity in a Costa Rican rainforest (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae), pp. 1-23.  In: Special Topics in Leaf Beetle Biology: Proceedings of the Fifth International Symposium on the Chrysomelidae. (D. G. Furth, Editor). Pensoft Publishers, Sofia-Moscow. Gilbert, LE and JT Smiley. 1978. Determinants of local diversity in phytophagous insects: Host specialists in tropical environments. In: LA Mound and N Waloff, eds., Diversity of Insect Faunas. Blackwell, London Kozak, Krzysztof M., Niklas Wahlberg, Andrew F.E.Nield, Kanchon K. Dasmahpatra, James Mallet, and Chris D. Jiggins 2015. Multilocus Species Trees Show the Recent Adaptive Radiation of the Mimetic Heliconius Butterflies. Syst. Biol. 64(3):505–524, 2015 Nahrstedt, A. and R.H. Davis 1983 Occurrence, Variation and Biosynthesis of the Cyanogenic Glucosides Linamarin and Lotaustralin in Species Of the Heliconiini (Insecta: Lepidoptera) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 75B, No. 1, pp. 65 to 73.  Poulton, Jonathan E. 1990 Cyanogenesis in Plants.  Plant Physiol. 94: 401-405 Smiley, J. T. 1978. The host plant ecology of Heliconius Butterflies in Northeastern Costa Rica. PhD Thesis, Univ. of Texas at Austin Smiley, J. T. 1978. Plant chemistry and the evolution of host specificity: New evidence from Heliconius and Passiflora. Science 201: 745-747 Smiley, J. T. 1982. The herbivores of Passiflora: Comparison of monophyletic and polyphyletic feeding guilds, in: Proc. 5th Internationial Symposium on Plant-insect Relationships, Wageningen 1982, Pudoc, Wageningen 1982. Smiley, J. T. 1985a Are chemical barriers necessary for butterfly- host plant coevolution? Oecologia 65: 580-583 Smiley, J.T. 1985b Heliconius caterpillar mortality during establishment on plants with and without attending ants. Ecology 66 (3): 845-849. Smiley, J. T. and CS Wisdom. 1985 Determinants of insect growth rate on heterogeneous host plants in a rainforest environment. Biochemical Systematics and Ecology 13: 305-312 Smiley, J.T. 1986. Ant constancy at Passiflora extrafloral nectaries: Effects on caterpillar survival. Ecology 67 (2): 516-521.  | Avances en la Investigación sobre Escarabajos Pulgas que se alimentan de Passiflora en La Selva,Agosto - Diciembre 2015John Smiley, 13 de junio de 2015IntroducciónComo está descrito en mi Informe de Progreso al MINAE fechado marzo de 2014, tuve la oportunidad de comparar la ecología de los escarabajos pulga con la ecología de las mariposas *Heliconius*, las cuales se encuentran en la planta bejuco *Passiflora* en La Selva. He creado un sitio web <http://johnterahsmiley.com/heliconius-passiflora-flea%20beetle/FB%20summary%202014/summary%202014.html> para compilar los resultados y el análisis de mi estudio hasta la fecha. Hasta ahora he sido capaz de identificar y describir las etapas larvales de seis especies de escarabajos pulga, incluyendo *Parchicola* DF2, *Parchicola* "tibia amarilla", *Ptocadica* "rojo", *Ptocadica bifasciata*, *Pedilia* "rojo" y *Disonycha quinquelineata*. Las larvas de las especies restantes *Monomacra violacea*, *M. chontalensis*, *Parchicola* "tibia negra" y *Ptocadica* "amarillo" todavía no se han observado y descrito. *M. violácea* es particularmente importante ya que es una especie muy común y se superpone con todas las otras especies.Para descubrir estas larvas voy a emplear métodos que tuvieron éxito con las otras especies de escarabajos pulga (ver más abajo). Para los adultos de *M. violacea* voy a utilizar *P. lobata* como planta huésped. Mis observaciones de campo sugieren que los escarabajos pueden reproducirse en esta planta.También voy a continuar las medidas de cianogenesis en *Heliconius*, escarabajos pulga y las *Passiflora*, con el fin de delinear la enorme variación que he encontrado hasta la fecha. Esta variación no se ha reportado en la literatura y las medidas recogidas en el campo abrirán un nuevo campo de investigación en la ecología de las passifloras y sus herbívoros.También seguiré documentando en el campo a las passifloras y sus escarabajos pulga. Esto le ayudará a clarificar las relaciones entre las especies y quizás conducir al descubrimiento de nuevas especies.Utilizaré la casa de sombra # 2 en La Selva para este trabajo, la cual cuenta con un conjunto de macetas de Passiflora de cada especie. También voy a utilizar más espacio en el laboratorio analítico y un banco en el laboratorio ambiental para la alimentación durante los ensayos y mediciones de cyanogensis. Finalmente, voy a utilizar el jardín de *Passiflora* como fuente de hojas, larvas y pulgas adultas escarabajos. Este jardín fue sembrado especialmente para este propósito el año pasado.Mi plan es llegar a La Selva el 06 de agosto de 2015 por 4 meses, partiendo el 9 de Diciembre de 2015.Mi colega el Dr. Carlos García-Robledo, del Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México y yo hemos ensamblado una base de datos de códigos de barras de ADN de referencia que contiene secuencias de todas las especies de Alticini que se alimentan de *Passiflora* en La Selva. Heos encontrado 10 especies de escarabajo pulga alimentándose de especies de *Passiflora* en La Selva, las mismas 10 especies que estaban presentes en 1976. Podríamos extender el análisis a nuevos especímenes recogidos durante esta nueva fase de nuestra investigación, usando la misma técnica o una mejorada. Este trabajo está cubierto por un permiso de CONAGEBIO (R-006, Expediente 188) del gobierno de Costa Rica.Objetivos:1. Recolectar aproximadamente 250 adultos y larvas de escarabajos pulga pertenecientes a entre 10 y 15 especies y llevarlas al laboratorio para su análisis y preservación. Las especies conocidas son: *Disonycha quinquelineata, Monomacra chontalensis, M. violacea*, "tibia negra " *Parchicola* "DF-2" *Parchicola*, "tibia amarilla" *Ptocadica bifasciata* *Parchicola*, , "rojo" Ptocadica, y *Ptocadica* "amarillo". Es posible que aparezcan nuecas especies de pulgas escarabajo en *Passiflora* durante este periodo, las cuales serán recolectadas y analizadas en el laboratorio. Las historias de vida de la mayoría de estos escarabajos son desconocidas para la ciencia.
2. En el laboratorio pondré los adultos de los escarabajos pulga en jaulas de malla con plantas de Passiflora en macetas. EntonAllí se observará su comportamiento y examinarán las plantas para ver si hay huevos y larvas de de escarabajos pulgas Cuando se encuentran, se fotografían los huevos, las larvas y las pupas para su eventual publicación, dado que nunca se han observado estas etapas de la vida de estas especies.
3. Se harán experimentos de preferencias de alimentación de los escarabajos adultos y de las larvas por en recipientes con hojas (o raíces y tallos, dependiendo de la especie) de diferentes especies de *Passiflora*.
4. Se preservarán especímenes de los escarabajos pulga para su posterior análisis, los cuales incluirán la preservación en la solución de Karnovsky para obtener imágenes de microscopio electrónico, especímenes enteros secos en puntos y alfileres, especímenes secos sin montar, y especímenes preservados en etanol al 95% para un futuro análisis genético. Estos especímenes harán los escarabajos accesible para los futuros investigadores que deseen explorar este sistema.
5. Se examinará el contenido de glucósidos cianogénicos en las plantas de *Passiflora* con el fin de determinar las fuentes de variación. Se prestará atención especial a las tres especies más variables, *Passiflora auriculata*, *P. biflora* y *P. ambigua*.
6. El proyeto creará una base de datos de los resultados de los análisis de cianogenesis, para ser utilizado por los investigadores futuros.
7. Todos los avistamientos en el campo de escarabajos pulgas serán registrados en una base de datos, incluyendo la ubicación, las especies de *Passiflora*, la presencia de hormigas, y las especies de escarabajos pulga. Estos datos serán añadidos a la matriz escarabajo pulga X *Passiflora*, delineando así aún más la relación.
8. Se creará y gestionará y una página web que presente información seleccionada sobre los hallazgos, la cual estará disponible abiertamente abierta a todos los usuarios.
9. También se publicarán descripciones de especies desconocidas, en colaboración con Davis Furth del Museo Nacional de los Estados Unidos. La información publicada sobre este sistema puede encontrarse en una forma muy preliminar en Smiley (1982).
10. Se añadirán a la colección de vouchers de las muestras fijadas y conservadas a ser depositadas en La Selva y, eventualmente, en el Museo Nacional de Costa Rica.
11. Finalmente, se harán actividades de educación dirigidas al público sobre el valor de la diversidad de insectos y plantas, al participar en la Feria Ambiental anual en La Selva, y por medio de charlas con visitantes a La Selva.

Métodos1. Las investigaciones sobre los escarabajo pulga en La Selva comenzaron en 1975, mientras que el muestreo de *Passiflora* para los huevos y larvas de *Heliconius*, culminó en 2012 - 2015 con una matriz de más de 1000 individuos, sus plantas hospederas, y la presencia o ausencia de hormigas acompañantes. Todos los meses del año se muestrearon excepto de Mayo a Julio. Los escarabajos pulga se muestrearon mediante el examen de las plantas individuales de Passiflora para observar daño por alimentación y si se observó daño, buscando la planta para escarabajos pulgas. Los escarabajos a menudo se ocultan debajo de las hojas y de vez en cuando en las hojas adyacentes a unos 5-10 centímetros de la planta huésped. Las plantas de *Passiflora* fueron localizadas en los senderos de la Estación Biológica La Selva, entre ellos aquellos que atraviesan bosques primarios incluyendo espacios de luz, borde del bosque donde los árboles se encuentran las áreas alteradas, y áreas de crecimiento secundario donde la tierra ha sido despejadas pero ahora está creciendo de nuevo. Este último hábitat incluye las parcelas de sucesión, áreas experimentales donde la vegetación se corta regularmente en una rotación de cinco años. La propiedad de La Selva contiene 14 especies de *Passiflora*, 12 de las cuales crecen en las elevaciones más bajas, donde s pueden muestrear fácilmente las mariposas y los escarabajos pulgas. Los adultos se cuentan varias veces en una planta dada durante un período de 2-3 meses, pero sólo la cuenta máxima para cada especie se registra con el fin de evitar contar dos veces los mismos escarabajos.
2. Los escarabajos adultos en las plantas serán capturados utilizando contenedores de polipropileno de dos onzas polipropileno con tapas. Teniendo cuidado de no tocar o agitar la planta, el contenedor abierto se coloca sobre el escarabajo. La tapa se coloca entonces enfrente del contenedor, debajo de la hoja. La hoja (y escarabajo) queda atrapados llevando suavemente la tapa y la copa juntos. Cuando se hace el contacto, el escarabajo brinca al contenedor, el cual se desliza suavemente de la hoja dejando el escarabajo atrapado. Las larvas de los escarabajos son capturadas mediante el corte de la hoja de sustrato y la colocación de la hoja en un contenedor, los cuales son llevados al laboratorio.
3. Los escarabajos recolectados en el campo se sacrifican por congelación o son utilizados en los experimentos de alimentación. Los escarabajos muertos o se montan en los puntos y alfileres y se colocan en una colección de insectos, o son preservados en etanol al 95% en tubos de microcentrífuga para el análisis genético, o conservadas en Karnovsky fijador para el análisis de microscopio electrónico. Los insectos en alfileres se dividen en una colección curada para el Museo Nacional, y una colección de vouchers de investigación para el Museo Nacional de los Estados Unidos. Los escarabajos vivos son manipulados por enfriamiento en una nevera o anestesiados con dióxido de carbono. Los permisos para esta investigación incluyen un permiso de recolección, un permiso de exportación de muestras, y el permiso existente "CONAGEBIO" (R-006-2014-OT-CONAGEBIO) para la realización de los análisis genéticos.
4. Se observarán y medirán la capacidad de las larvas del escarabajo pulga y de los adultos de consumir plantas hospederas alternas dentro de *Passiflora*. Las larvas y los adultos se ponen a prueba por su inclusión por separado en una caja de plástico de la marca "Glad" aproximadamente 15x20cm x 10 cm de profundidad. Las cajas se modifican con un agujero de diámetro de 7 mm en el lado, adecuado para la inserción de un tubo de diámetro exterior de 6 mm. Cuando los escarabajos van a ser manipulados se conecta el tubo a un suministro de CO2 y se purga el gas dentro de la caja de plástico hasta que los escarabajos dejan de moverse. Para ello se utiliza un globo de la fiesta grande llenado de un tanque de CO2 de laboratorio, equipado con una válvula. Secciones de plantas se recortan para colocar en la caja y los tallos se insertan en pequeños frascos llenos de agua con tapones de algodón. Se observa la alimentación diaria y se registra el área foliar comida.
5. A excepción de *Pedilia* "rojo", los estados inmaduros son difíciles de encontrar. Las larvas de *Ptocadica* se ven ocasionalmente en *P. auriculata* y *P. biflora* (*Pt. Bifasciata*) y el *P. lobata* (Pt. "Rojo"). *Pedilia* se pone en el laboratorio de pruebas de alimentación. Pt. larvas "rojo" se obtienen colocando el adulto Pt. "rojo" en una planta *P. lobata* en las casas de sombra, y se espera hasta que pongan los huevos y las larvas emergieron. Puesta de huevos. La observación de las larvas también se llevan a cabo mediante la colocación de plantas en macetas colapsables Bioquip de 60x60cm x 90cm de altura. De dos a diez escarabajos adultos se liberan en cada jaula. Las jaulas son revisados cada 2-3 días para observar conducta de apareamiento, la aparición de huevos, larvas y adultos nuevos. Cuando se observan los huevos o larvas de la planta en las macetas son retirados para su análisis.
6. Ensayos de alimentación y las jaulas de cría de larvas se mantuvieron en el laboratorio de La Selva "ambient", abierto a la circulación del aire exterior y la temperatura y humedad que ofrece condiciones similares a los valores ambientales. Las jaulas con plantas en macetas se mantienen en una casa "sombra" abierto a la lluvia y parcialmente sombreados para proporcionar buenas condiciones para el crecimiento de las plantas en maceta.
7. Análisis Genéticos. Se colocará una muestra representativa de ocho de las especies de escarabajos pulga en tubos de microcentrífuga con alcohol, guardando de 13 a 23 adultos o larvas de cada especie. Para las especies más raras donde esto no sea posible, por ejemplo *Ptocadica* "amarillo," se representarán sólo dos veces y no se muestreará ningún especímen de *Monomacra chontalensis* y *Disonycha quinquelineata*. Los tubos se mantienen en refrigeración a -27 grados C, excepto durante la preparación del transporte y de la muestra. Con el tiempo, las patas de los escarabajos pulgas u otras partes pequeñas del cuerpo (larvas) se colocarán en placas de 96 unidades, en solución tampón, y las placas se envían por correo a Carlos García-Robledo en el Museo Nacional de los Estados Unidos. El Dr. García-Robledo procesará las muestras junto con otros Chrysomelidae Neotropicales, utilizando procedimientos genéticos de "códigos de barras" descritos en García-Robledo (2013). Los procedimientos incluyen la secuenciación de la región del citocromo oxidasa (CO I) del genoma mitocondrial de cada espécimen. Luego se creará una tabla de similitudes entre todos los individuos, usando Geneious Pro (v. 5.6.5) para generar un árbol con las estadísticas de rutina (100 repeticiones) para evaluar las diferencias entre las especies.
8. Usando un medidor portátil de gas de cianuro desarrollado para el personal de respuestas a emergencias cuando deben entrar a entrar situaciones peligrosas, se desarrolló un método para medir partes por millón (ppm) de gas HCN producidas por tejidos vegetales y animales macerados. Este procedimiento emplea un recipiente de plástico de 150 ml para contener y concentrar el HCN liberado de la muestra, y una bomba de aire para suministrar el gas desde la copa hasta el medidor. La técnica es moderadamente sensible, lo que permite la cuantificación de sólo unas pocas centésimas de un micromol de gas HCN por gramo de tejido y es razonablemente precisa, produciendo valores con menos de 10% de variación alrededor de la media. Desafortunadamente, aproximadamente la mitad del HCN se pierde durante la medición, de modo que las partes por millón medidos son aproximadamente el 50% de la verdadera cantidad absoluta. El porcentaje de pérdida es consistente, sin embargo, y como se descubrió, es insignificante en comparación con la variabilidad real en las plantas. Para hacer mediciones más precisas, también se desarrolló un procedimiento de "sistema cerrado." Esta técnica da lecturas sin pérdidas de gas que son tan precisos como el instrumento permite. Sin embargo, dado el equipo disponible, este procedimiento es mucho menos sensible y lleva mucho más tiempo que la técnica del vaso de plástico. Para más detalles sobre la técnica de medición favor ver: <http://johnterahsmiley.com/heliconius-passiflora-flea%20beetle/FB%20summary%202014/Appendix%201.html>

BibliografíaWW Benson, KS Brown Jr., y LE Gilbert, "coevolución de las plantas y los herbívoros: mariposas flor de la pasión," Evolución, vol. 29, no. 4, pp. 659-680, 1.975.Brown, Keith S. 1981. La biología de Heliconius y géneros relacionados. Ana. Rev. Entomología 26: 427-56Duckett, Catherine N. 2003. Una nueva especie de escarabajo pulga, género Pedilia Clark (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae), de Osa Pennisula, Costa Rica. Zootaxa 158: 1-8Duckett, Catherine N. y Sandra Moya. 1999. Una nueva especie de Ptocadica (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticini) de Costa Rica y Panamá. El Coleopterists Bulletin 53 (4); 311 hasta 319Engler, Helene S., Kevin C. Spencer, Lawrence E. Gilbert 2008 Prevención de cianuro de lanzamiento de las hojas de la Naturaleza 406: 144-45Engler-Chaouat, Helene S. y Lawrence E. Gilbert. 2006. síntesis de novo vs. Secuestro: correlacionadas negativamente en metabólicos Rasgos y la Evolución de Plantas Huéspedes de Especialización en cianogénicos Mariposas. J Chem Ecol (2007) 33: 25-42Furth, D. G., J. T. Longino, y M. Paniagua. 2003. Estudio y evaluación cuantitativa de la diversidad de escarabajos pulga en una selva tropical de Costa Rica (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae)., Pp 1.23. En: Temas Especiales en la hoja Escarabajo Biología: Actas del Quinto Simposio Internacional sobre la Chrysomelidae. (D. G. Furth, Editor). Pensoft Publishers, Sofía-Moscú.Gilbert, LE y JT Smiley. 1978. Factores determinantes de la diversidad local de insectos fitófagos: especialistas del lenguaje principal en ambientes tropicales. En: LA Montículo y N Waloff, eds, Diversidad de Insectos faunas.. Blackwell, LondresKozak, Krzysztof M., Niklas Wahlberg, Andrew FENield, Kanchon K. Dasmahpatra, James Mallet, y Chris D. Jiggins 2015. Multilocus especies Arboles Mostrar la reciente adaptación de Radiación de los miméticos Heliconius mariposas. Syst. Biol. 64 (3): 505-524, 2015Nahrstedt, A. y RH Davis 1.983 Ocurrencia, Variación y biosíntesis de los glucósidos cianogénicos linamarina y lotaustralina de Especies de la heliconiini (Insecta: Lepidoptera) Comp. Biochem. Physiol. Vol. 75B, No. 1, pp. 65 a 73. Poulton, Jonathan E. 1990 cianogenesis en plantas. Physiol Plant. 94: 401 hasta 405Smiley, JT 1978. La planta ecología serie de Heliconius mariposas en el noreste de Costa Rica. Tesis doctoral, Univ. de Texas en AustinSmiley, JT 1978. Planta química y la evolución de la especificidad del hospedador: Nuevas pruebas de Heliconius y Passiflora. Ciencia 201: 745 a 747Smiley, JT 1982. Los herbívoros de Passiflora: Comparación de los gremios de alimentación monofiléticos y polifilético, en: Proc. 5º Simposio Internationial en Relaciones Planta-insectos, Wageningen 1982, Pudoc, Wageningen 1982.Smiley, JT 1985a barreras químicas necesarias para Butterfly- coevolución planta huésped? Oecologia 65: 580-583Smiley, J. T. La mortalidad oruga 1985b Heliconius durante el establecimiento de plantas con y sin asistir a las hormigas. Ecología 66 (3): 845-849.Smiley, J. T. y CS Sabiduría. 1985 Factores determinantes de la tasa de crecimiento de insectos en las plantas hospederas heterogéneos en un entorno de selva tropical. Bioquímicos Sistemática y Ecología 13: 305-312Smiley, J. T. 1986. constancia Hormiga en nectarios extraflorales Passiflora: Efectos sobre la supervivencia oruga. Ecología 67 (2): 516-521. |