

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE ESPÉCIES DE *Trypargilum* E ANÁLISES  
DE PARENTESCO GENÉTICO INTRANIDAL E GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE  
*Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)

Antonio Carlos Bragato Bergamaschi

São Carlos - SP

2013

**Antonio Carlos Bragato Bergamaschi**

**COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE ESPÉCIES DE *Trypargilum* E ANÁLISES  
DE PARENTESCO GENÉTICO INTRANIDAL E GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE  
*Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Evolução, Área de Concentração: Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

**São Carlos - SP**

**2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B493cr

Bergamaschi, Antonio Carlos Bragato

Comportamento reprodutivo de espécies de *Trypargilum* e análises de parentesco genético intranidal e genética de populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae) / Antonio Carlos Bragato Bergamaschi. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

106 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Genética. 2. *Trypoxylon*. 3. Comportamento. 4. Parentesco intranidal. 5. Genética de populações. 6. Microsatélites. I. Título.

CDD: 575.1 (20<sup>a</sup>)

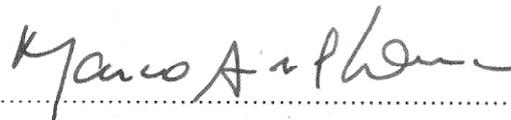
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

“COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DE ESPÉCIES DE *Trypargilum* E ANÁLISES DE  
PARENTESCO GENÉTICO INTRANIDAL E GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE  
*Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)”

Tese de Doutorado de  
**ANTONIO CARLOS BRAGATO BERGAMASCHI**

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama



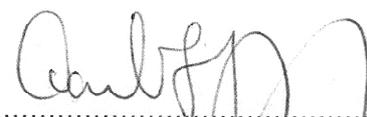
.....

Profa. Dra. Maria Luisa Tunes Buschini



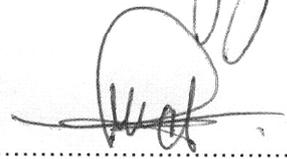
.....

Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo



.....

Prof. Dr. Lúcio Antonio de Oliveira Campos



.....

Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia



.....

Aos meus pais, Antonio e Nilda, pelo carinho, conforto, confiança e total apoio,

Dedico.

“Nada na biologia faz sentido exceto à luz da evolução”

Theodosius Dobzhansky

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama, pela oportunidade de trabalho e por estar sempre disposto e paciente para tirar minhas dúvidas. Agradeço também pela oportunidade concedida na disciplina “Estágio Supervisionado de Capacitação Docente”, a qual constituiu uma experiência muito importante como referência para minha vida pessoal e profissional. É com muita admiração e respeito que demonstro meu sincero agradecimento.

Aos colegas e grandes incentivadores do Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros, pelo ótimo ambiente de trabalho e pelos ensinamentos que melhoraram decisivamente minha pesquisa: Antônio Carvalho, Camila H. da Silva, Cíntia Oi, Diego Moure, Elder Miranda, Gabriele Freiria, Isabel Godoy, Juliana Afonso, Juliano Almeida, Kátia Ferreira, Keize Nagamati, Luana Bergamo, Marcella Peixoto, Marcos Robalinho, Natália Cerântola, Otávio Lino e Taís Collet.

Aos financiadores e apoiadores da pesquisa científica: (1) ao CNPq, pelo financiamento do projeto; (2) à CAPES pela concessão da bolsa de estudos; (3) ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, pela estrutura acadêmica; (4) ao Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), por toda estrutura física e suporte técnico-laboratorial e (5) ao Laboratório de Genética de Animais Domésticos, pelo suporte nas genotipagens utilizando o sequenciador automático.

Os meus agradecimentos ao Sr. Íris Stanciola (UFV), à Profa. Dra. Maria José de Oliveira Campos (UNESP) e ao Prof. Dr. Marco Antonio Costa (UESC) pelo suporte durante amostragens populacionais de *Trypoxylon albitarse*.

À Profa. Dra. Maria Luísa Tunes Buschini (UNICENTRO), pela contribuição significativa durante o planejamento e realização deste estudo, e pelo apoio prestado durante as amostragens em Guarapuava.

A todos os meus familiares, em especial meus pais, Antonio e Nilda, pelo apoio incondicional, por acreditarem nos meus sonhos e suportarem minha ausência na vida familiar.

Aos grandes amigos de longe, mas que sempre estiveram perto com palavras de incentivo e amizade: Adriane Witkoviski, Aline Tanaca, Caroline Oliveira, Cecília

Kosmann, Daniele Pegorini, Danilo Pacheco, Debora Pacchioni, Elaine Fantinatti, Elina Giacomini, Diana Kleinubing, Fernando Anjolette, Gabriel de Paula, Kely Rocha, Matheus Becchi, Milehna Guarido e Patrícia Ziliotto.

Às pessoas que durante o desenvolvimento deste trabalho passaram a fazer parte da minha vida e proporcionaram momentos agradáveis de convivência dentro ou fora da universidade: Aymê Lechiu, Bruno Gonçalves, Daiane Rocha, Hércules Dias, Laís Oliveira, Leandro Delazaro, Mariana Santoni, Mateus Bragança, Priscila Oliveira, Regina Câmara, Rodrigo Alves, Rodrigo Moura e Thaís Ferreira.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1. Introdução Geral e Objetivos .....</b>	<b>7</b>
1.1. Aspectos relevantes da ordem Hymenoptera .....	7
1.2. O gênero <i>Trypoxylon</i> .....	9
1.3. Comportamento de macho guarda em Sphecidae e Crabronidae .....	12
1.4. Estudos genéticos envolvendo <i>Trypoxylon</i> .....	14
1.5. Objetivos .....	16
<b>CAPÍTULO 2. Atividade de nidificação de três espécies de <i>Trypoxylon</i> (<i>Trypargilum</i>) Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae), incluindo uma breve revisão sobre a literatura recente .....</b>	<b>17</b>
2.1. Introdução .....	18
2.2. Material e Métodos .....	19
2.3. Resultados .....	21
2.3.1. Aspectos gerais observados para as três espécies .....	21
2.3.2. <i>Trypoxylon agamemnon</i> .....	23
2.3.2. <i>Trypoxylon aurifrons</i> .....	25
2.3.2. <i>Trypoxylon nitidum</i> .....	27
2.4. Discussão e breve revisão da literatura recente .....	30
<b>CAPÍTULO 3. Estrutura genética em ninhos de <i>Trypoxylon</i> (<i>Trypargilum</i>) <i>albitarse</i> Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae) .....</b>	<b>42</b>
3.1. Introdução .....	43
3.2. Material e Métodos .....	45

3.2.1. Aspectos relevantes sobre a espécie <i>Trypoxylon albitarse</i> e seu comportamento .....	45
3.2.2. Áreas de estudo e trabalho a campo.....	47
3.2.3. Análises genéticas por locos microssatélites .....	49
3.3. Resultados .....	52
3.4. Discussão .....	56
<b>CAPÍTULO 4. Variação gênica e diferenciação genética entre populações de <i>Trypoxylon (Trypargilum) albitarse</i> Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae).</b>	<b>60</b>
4.1. Introdução .....	61
4.2. Material e Métodos .....	63
4.2.1. Trabalho a campo e amostragem.....	63
4.2.2. Extração do DNA, amplificação dos locos microssatélites e genotipagem .	65
4.2.3. Análise dos dados .....	67
4.3. Resultados .....	69
4.3.1. Estimativas de diversidade e variabilidade genética .....	69
4.3.2. Estrutura genética .....	71
4.4. Discussão .....	74
<b>CAPÍTULO 5. Considerações finais e perspectivas .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 2: Atividade de nidificação de três espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae), incluindo uma breve revisão sobre a literatura recente**

**Figura 1. A.** Bloco contendo ninhos-armadilha confeccionados com madeira instalados no Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava, PR. **B.** Bloco contendo ninhos-armadilha confeccionados com gomos de bambu seco, colocados em regiões cobertas do *campus* da UFSCar, São Carlos, SP. Escala: 10 mm .....**p.26**

**Figura 2.** Espécimes de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) marcados com tinta atóxica durante as observações a campo. Escala: 10 mm .....**p.26**

**Figura 3. A.** No canto superior direito, uma fêmea de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *agememnon* entrando em uma cavidade vazia ao inspecionar ninhos candidados para iniciar a fundação; no canto inferior esquerdo, um casal desta espécie em nidificação, com o macho posicionado sobre o corpo da fêmea, antes de entrarem no ninho-armadilha. **B.** Macho patrulheiro de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aurifrons* posicionado próximo à entrada de um ninho ativo no momento em que a fêmea chegou do forrageio, pouco antes de uma tentativa de cópula extrapar. Escala: 10 mm .....**p.26**

### **CAPÍTULO 3: Estrutura genética em ninhos de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae)**

**Figura 1.** Fêmea de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* distribuindo o barro na construção de um tubo, formando cristas na forma de “V” invertido. Escala: 12 mm .....**p.46**

**Figura 2.** Exemplos de ninhos físicos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. A sequência em que os tubos de barro foram construídos (representada pelas letras A, B ou C) foi inferida graças à sua disposição justaposta, utilizando parte da parede do tubo construído anteriormente na construção de um novo. Escala: 15 mm ....**p.46**

#### **CAPÍTULO 4: Variação gênica e diferenciação genética entre populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1084 (Hymenoptera: Crabronidae)**

**Figura 1.** Mapa das populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* amostradas para este estudo. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1 .....**p.61**

**Figura 2.** Estrutura populacional estimada por inferência Bayesiana para cinco populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, obtida no gráfico de uma corrida para  $K=2$ . Cada indivíduo representa uma linha vertical, em que a cor indica sua chance de atribuição a cada um dos agrupamentos alternativos (escala à esquerda) .....**p.71**

**Figura 3.** Análise de componentes principais (PCA) de cinco populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA), baseada na distância genética obtida através de marcadores microssatélites .....**p.71**

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 3: Estrutura genética em ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae)**

**Tabela 1:** Sumário da estrutura genética de 29 ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* coletados em seis localidades brasileiras .....**p.53**

### **CAPÍTULO 4: Variação gênica e diferenciação genética entre populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1084 (Hymenoptera: Crabronidae)**

**Tabela 1.** Códigos dos locais de amostragem, localização (incluindo o município e a região brasileira), coordenadas geográficas e número de ninhos amostrados em cada uma das cinco localidades onde espécimes de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* foram coletados .....**p.62**

**Tabela 2.** Distância geográfica entre os cinco locais de amostragem de ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1 .....**p.62**

**Tabela 3.** Tamanho amostral ( $n$ ), heterozigotidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e valores de  $P$  para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em cinco populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1 .....**p.68**

**Tabela 4:** Valores de riqueza alélica ( $A$ ) e de alelos privados ( $A_p$ ) para as cinco populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, estimados a partir do método de rarefação. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1 .....**p.68**

**Tabela 5.** Comparação par a par dos valores de  $F_{st}$  (abaixo da diagonal) e  $D_{est}$  (acima da diagonal) para pares de populações de *Trypoxylon (Trypargilum)*

*albitarse*. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1 .....**p.69**

**Tabela 6. Tabela 6.** Resultados da análise molecular de variância (AMOVA), com os valores da distribuição da variação dentro e entre as cinco populações amostradas de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* .....**p.70**

## RESUMO

O gênero *Trypoxylon* é constituído de vespas solitárias que constroem ninhos de barro ou nidificam em cavidades preexistentes, onde células de cria dispostas linearmente são estocadas com aranhas paralisadas. O macho em espécies do subgênero *Trypargilum* apresenta um comportamento singular entre os Hymenoptera, exercendo o papel de guarda em ninhos ativos, o que lhe garante cópulas repetidas com a parceira que interage, especialmente antes da oviposição. É de se esperar que este comportamento aumente as chances de sucesso reprodutivo do macho guarda. No entanto, a presença constante de machos patrulheiros em áreas de nidificação, aliada a relatos de estudos comportamentais que apontaram a receptividade de fêmeas já assistidas por um macho guarda a cópulas extrapar, coloca em dúvida a efetividade da tática reprodutiva adotada pelo guarda. O objetivo deste estudo foi contribuir para o conhecimento da história natural de espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*), através de registros comportamentais, análises genéticas de parentesco intranidal e análises de diversidade e estruturação populacional. O comportamento de nidificação de *Trypoxylon agamemnon*, *Trypoxylon aurifrons* e *Trypoxylon nitidum* foi registrado em ninhos-armadilha, focando principalmente a interação entre o macho guarda e a fêmea construtora, além do papel do macho patrulheiro, que esteve constantemente posicionado próximo a ninhos ativos. Análises genéticas de parentesco intranidal utilizando locos microssatélites espécie específicos de *Trypoxylon albitarse* indicaram que esta espécie possui um sistema de acasalamento predominantemente monogâmico, apesar de cópulas extrapar terem sido detectadas. Uma vez que pouco se conhece sobre a genética de populações desse grupo de vespas, apresentamos também dados referentes à diversidade e estrutura genéticas de cinco populações de *T. albitarse*, provenientes de quatro estados do Brasil, os quais indicaram altos índices de diversidade genética e estruturação populacional significativa.

**Palavras-chave:** *Trypoxylon*, comportamento, parentesco intranidal, genética de populações, microssatélites.

## ABSTRACT

The genus *Trypoxylon* consists of solitary wasps that build mud nests or nest in pre-existing cavities, which brood cells positioned linearly are stored with paralyzed spiders. The male in species of the subgenus *Trypargilum* presents a singular behavior among Hymenoptera, playing the role of guard in active nests, which guarantees repeated copulations with the partner that interacts, especially before oviposition. It is expected that this behavior increases the chances of reproductive success of the guarding male. However, the constant presence of satellite males in nesting areas, associated to reports obtained in behavioral studies that pointed the receptivity of females assisted by a guarding male to extra-pair copulations, lay doubts in the effectiveness of reproductive tactics adopted by the guard. The aim of this study was to contribute to the knowledge of natural history of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) species, through behavioral records, genetic analyzes of intranidal relatedness and analyzes of diversity and population structure. The nesting behavior of *Trypoxylon agamemnon*, *Trypoxylon aurifrons* and *Trypoxylon nitidum* in trap nests was recorded, mainly focusing on the interaction between the guarding male and the nesting female, beyond the role of the satellite male, who was constantly positioned near active nests. Genetic analysis of intranidal relatedness using species-specific microsatellite loci for *Trypoxylon albitarse* indicated that this species has a predominantly monogamous mating system, although extra-pair copulations have been detected. Since little is known about the population genetics of this group of wasps, we also present data from the genetic diversity and structure of five populations of *T. albitarse*, sampled in four states in Brazil, which indicated high levels of genetic diversity and significantly population structure.

**Key words:** *Trypoxylon*, behavior, intranidal relatedness, population genetics, microsatellites.

## CAPÍTULO 1: Introdução Geral e Objetivos

---

### 1.1. Aspectos relevantes da ordem Hymenoptera

Hymenoptera é uma das maiores ordens da classe Insecta, incluindo aproximadamente 115.000 espécies descritas (SHARKEY, 2007). Estas espécies apresentam estreita relação com o homem, pois são consideradas importantes agentes polinizadores e parte delas são responsáveis pela síntese de produtos comercialmente importantes como mel, cera, própolis e geléia real. Além disso, algumas são parasitoides de pragas na agricultura, sendo utilizadas em programas de controle biológico, enquanto outras são consideradas pragas agrícolas (BORROR *et al.*, 1989; GALLO *et al.*, 2002). Apresentam algumas particularidades que as tornam espécies consideradas organismos modelo para estudos biológicos, tais como a presença do sistema haplodiplóide de determinação do sexo e diferentes níveis de organização social (MICHENER, 1974; GOULET & HUBER, 1993; GAULD & BOLTON, 1996).

O modo dominante e ancestral de determinação do sexo na maioria das espécies da ordem é o sistema haplodiplóide por partenogênese arrenótoca, com fêmeas diploides se desenvolvendo a partir de óvulos fertilizados e machos haploides a partir de óvulos não fertilizados (TRIVERS & HARE, 1976; HEIMPEL & BOER, 2008). Dessa forma, a gametogênese ocorre de maneira usual nas fêmeas (com a meiose resultando em gametas haploides), enquanto nos machos, a meiose não tem caráter reducional (GAULD & BOLTON, 1996).

O mecanismo mais estudado e melhor compreendido sobre a determinação do sexo por haplodiploidia no táxon é o loco CSD (*Complementary Sex Determination*) (HEIMPEL & BOER, 2008). Quando em heterozigose este loco determina o desenvolvimento de fêmeas e, em hemizigose, machos haploides. A ocorrência de alelos do loco CSD em homozigose resulta na formação de machos diploides (HEDRICK *et al.*, 2006) que, geralmente são pouco viáveis e possuem baixo ou nenhum valor adaptativo (COOK, 1993; CROZIER & PAMILO, 1996; ZAYED, 2004; ZAYED & PACKER, 2005). Apesar disso, a literatura conta com

alguns exemplos de machos diploides reprodutivamente viáveis (DUCHATEAU & MARIEN, 1995; COWAN & STAHLHUT, 2004; STAHLHUT & COWAN, 2004; KURECK *et al.*, 2013).

A haplodiploidia pode refletir no conflito de interesses entre machos e fêmeas na determinação do sexo da prole (GRAFEN, 1986; BROCKMANN & GRAFEN, 1992; BROCKMANN, 2004), uma vez que a fêmea pode alternar facultativamente a razão sexual de sua progênie, escolhendo depositar um ovo fertilizado ou não fertilizado, que dará origem a uma fêmea ou macho, respectivamente (FLANDERS, 1965; GERBER & KLOSTERMEYER, 1970; CHARNOV, 1982). Vale lembrar que o sucesso reprodutivo do macho é determinado pelo número de filhas que ele tem, e para a fêmea, não havendo seleção sexo dependente, a produção de filhas e filhos é indiferente (MOLUMBY, 1997; PERUQUETTI & DEL LAMA, 2003).

Esse sistema também implica na assimetria de parentesco entre indivíduos de uma família geneticamente monogâmica. Nesse caso, filhas compartilham entre si, em média, 75% do material genético (25% herdado da mãe e 50% herdado do pai) e 25% com seus irmãos (25% da mãe e 0% do pai) (HAMILTON, 1964). Essa assimetria parece ter sido uma condição favorável à evolução do comportamento social nos himenópteros (HAMILTON, 1964), que apresentam desde espécies com comportamento solitário, caracterizado pela independência das fêmeas na construção e aprovisionamento de seus ninhos, até espécies que apresentam comportamento eussocial, em que é possível observar a presença de castas e cuidado aloparental (MICHENER, 1974; CRESPI & YANEGA, 1995). Apesar de encontrarmos diversos níveis de interações sociais no grupo, o hábito solitário ainda é o predominante (CRESPI & YANEGA, 1995).

## 1.2. O gênero *Trypoxylon*

Dentre os Aculeata, se destaca a família Crabronidae, que constitui um grupo de vespas em que a maior parte das espécies não apresenta organização social e possui uma ampla gama de estratégias de nidificação e forrageamento (MELO, 2000; O'NEILL, 2001). A família é cosmopolita e conta com cerca de 9000 espécies (PULAWSKI, 2013). Por muito tempo, foi considerada parte de Sphecidae; porém, atualmente o *status* de família, proposto inicialmente por Bohart & Menke (1976) já é reconhecido, posicionando este grupo de vespas dentro da superfamília Apoidea ao lado de Apidae, Sphecidae, Ampulicidae, Heterogynaidae (LOMHOLDT, 1982; ALEXANDER, 1992; BROTHERS, 1999; MELO, 1999; MELO & GONÇALVES, 2005; DEBEVEC, 2012).

*Trypoxylon* é o gênero mais diverso de Crabronidae e conta com 634 espécies descritas, as quais apresentam ampla distribuição geográfica (PULAWSKI, 2013). São vespas solitárias cujas fêmeas são responsáveis pela construção de seus ninhos. O provisionamento é feito de forma massal com aranhas paralisadas em células de cria, dispostas linearmente em cavidades preexistentes ou tubos construídos com barro. Uma oviposição ocorre ao final do provisionamento de cada célula, sobre o abdômen de uma das presas estocadas. Logo em seguida, uma parede divisória de barro é construída para o fechamento da célula. Após finalizar a última célula do ninho, a fêmea usualmente fecha a entrada do tubo com uma camada mais grossa de barro (BOHART & MENKE, 1976; COVILLE, 1982).

Richards (1934) dividiu este gênero nos subgêneros *Trypoxylon* e *Trypargilum*. Krombein (1967) sugeriu uma nova classificação elevando os dois subgêneros ao *status* de gênero. Posteriormente Bohart & Menke (1976) e Coville (1982) discordaram de Krombein e revalidaram a classificação proposta por Richards (1934). Segundo Amarante (2005), a atual classificação infragenérica de *Trypoxylon* requer mais investigação, pois *Trypoxylon s. str.* pode ser parafilético devido à dificuldade na identificação de sinapomorfias apoiando o grupo. Os subgêneros podem ser diferenciados por caracteres morfológicos, além de apresentarem diferenças biológicas e comportamentais, dentre as quais se destaca

o comportamento de guarda exibido por machos de *Trypargilum* durante o processo de nidificação (COVILLE, 1982).

O subgênero *Trypargilum* foi dividido por Richards (1934) nos grupos *albitarse*, *superbum*, *puntulatum*, *spinosum* e *nitidum*, os quais também foram subdivididos em complexos. Os grupos e complexos apresentam características biológicas, morfológicas e comportamentais uniformes, o que sugere que, apesar das relações filogenéticas do táxon ainda não serem conhecidas, provavelmente representem entidades naturais, formando grupos monofiléticos (KROMBEIN, 1967; MATTHEWS & MATTHEWS, 1968; LIN, 1969; COVILLE, 1979; AMARANTE, 1991a). Uma das diferenças mais marcantes entre os grupos de *Trypargilum* está no fato de que espécies do grupo *albitarse* nidificam em tubos de barro construídos pelas fêmeas, enquanto que as espécies dos demais grupos têm o hábito de nidificar em cavidades preexistentes (COVILLE, 1979).

A literatura dispõe de uma série de estudos realizados no intuito de enumerar as espécies do gênero e registrar seus locais de ocorrência. Inicialmente, Richards (1934) listou as espécies de *Trypoxylon* dos Estados Unidos e Sandhouse (1940) catalogou as espécies da Região Neártica. Outra listagem de espécies do gênero encontra-se no catálogo dos Sphecidae do mundo de Bohart & Menke (1976). Coville (1982) catalogou as espécies do subgênero *Trypargilum* da América do Norte. Amarante (2002) elaborou um catálogo sinonímico de Sphecidae para a Região Neotropical com a distribuição geográfica das espécies, dando destaque aos estados brasileiros e províncias argentinas, abordando também novos registros para diversas espécies.

Dentre as espécies descritas para o subgênero *Trypargilum*, a maior parte é endêmica da América do Sul (AMARANTE, 2002). Por concentrar uma grande riqueza de espécies, a região Neotropical foi alvo de muitos estudos no intuito de obter dados sobre a história natural deste subgênero. Algumas pesquisas foram realizadas na Costa Rica (COVILLE & COVILLE, 1980; COVILLE, 1981; COVILLE & GRISWOLD, 1983, 1984; MATTHEWS, 1983; BROCKMANN, 1992; COVILLE *et al.*, 2000), México (DOMÍNGUEZ & JIMÉNEZ, 2008), Cuba (RICHARDS, 1969; GENARO *et al.*, 1989; GENARO & ALAYÓN 1994; GENARO, 1996, 2007, 2008), Jamaica (JAYAHSINGH & FREEMAN, 1980a, b), Trinidad e Tobago (FREEMAN,

1981) e Argentina (MUSICANTE & SALVO, 2010). No entanto, a maior parte dos estudos relacionados à fauna Neotropical foi realizada no Brasil, em diversas áreas da pesquisa biológica, tais como: taxonomia, distribuição espacial, biologia, comportamento, alocação sexual, parentesco intranidal, morfologia e estudos citogenéticos (AMARANTE, 1991a, 1991b, 1995, 2002, 2005a, 2005b; PÉREZ-MALUF, 1992; CAMILLO *et al.*, 1993, 1994, 1995; GARÓFALO *et al.*, 1993, 1995; GARCIA & ADIS, 1995; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1995, 1997; SCHER, 1996; ASSIS & CAMILO, 1997; CAMILLO, 1999; CAMILLO & BRESCOVIT, 1999a, 1999b, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2000, 2001, 2002a, 2002b, 2009; BORGES & BLOCKTEIN 2001; ARAÚJO, 2002; ALVES-DOS-SANTOS, 2003; BUYS, 2003; 2005, 2007; GAZOLA, 2003; PERUQUETTI, 2003, 2005; PERUQUETTI & DEL LAMA, 2003; SHER & POMPOLO, 2003; SANCHEZ & POMPOLO, 2004; BUSCHINI, 2006, 2007; BUSCHINI & WOLF, 2006; BUSCHINI *et al.*, 2006, 2008, 2010a, 2010b; LOYOLA & MARTINS, 2006; ARAÚJO & GONZAGA, 2007; MOREIRA, 2007; SANTONI & DEL LAMA, 2007; BUSCHINI & WOISKI, 2008; MORATO *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2008; SANTONI, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2009; BERTON *et al.*, 2009; GAZOLA & GARÓFALO, 2009; SANTONI *et al.*, 2009; ALMEIDA, 2010; BUSCHINI & BERGAMASCHI, 2010, *in press*; BUSCHINI & FARJADO, 2010; MENEZES *et al.*, 2011; NASCIMENTO, 2011; BUSCHINI & DONATTI, 2012; FOX *et al.*, 2012; PITILIN *et al.*, 2012, ALMEIDA *et al.*, 2013).

Grande parte das informações bionômicas obtidas nos trabalhos citados acima se deve ao fato de que muitas espécies de *Trypargilum* nidificam com sucesso em cavidades artificiais, facilitando a amostragem através da técnica de ninhos-armadilha. Esta técnica foi introduzida no Brasil por Serrano & Garófalo (1978) e contribuiu significativamente para a obtenção de informações bionômicas das espécies mais comuns do subgênero, pois seu uso permite que os ninhos fundados sejam convenientemente observados no campo e, quando necessário, podem ser facilmente levados ao laboratório para estudos mais detalhados (KROMBEIN, 1967).

### 1.3. Comportamento de macho guarda em Sphecidae e Crabronidae

A ocorrência de cuidado maternal é generalizada entre os Hymenoptera, porém são escassos os relatos de machos da ordem auxiliando fêmeas em alguma atividade. Na maioria das espécies da ordem o macho tem apenas função reprodutiva e o cuidado paternal é raro nesta ordem (MICHENER, 1974; MELO, 2000), tal como ocorre com os demais insetos (EVANS & WEST-EBERHARD, 1970; WILSON, 1971, BOHART & MENKE, 1976; MAKINO, 1983; CAMERON, 1986).

Os sistemas de acasalamento em vespas são muito diversos (ALCOCK *et al.*, 1978). Os machos adotam diferentes táticas reprodutivas, na maioria das vezes em função da distribuição espacial de fêmeas disponíveis para acasalamento (TORRHILL & ALCOCK, 1983). Nas espécies em que as fêmeas são receptivas e copulam repetidamente durante toda a vida, os machos tendem a se estabelecer nos locais de nidificação (AMARANTE, 1991a). Nesse sentido, algumas espécies de vespas solitárias das famílias Crabronidae e Sphecidae apresentam machos exibindo um comportamento diferenciado, denominado macho guarda ou sentinela, o qual se caracteriza pela defesa territorial do ninho contra ataques de parasitoides, predadores e rivais intra-específicos (BROCKMANN, 1980; COVILLE & COVILLE, 1980).

O comportamento de guarda foi registrado pela primeira vez em machos de *Trypargilum* por Peckham & Peckham (1895), que utilizaram como objeto de estudo as espécies *T. colinum*, *T. rubrocinctum* e *T. lactitarse*. Com o passar do tempo, outras espécies do subgênero também foram estudadas sob essa perspectiva (PECKHAM & PECKHAM, 1898; HARTMAN, 1905; RAU & RAU, 1916; RAU, 1928), até que Richards (1934) generalizou tal comportamento como uma sinapomorfia entre os machos do táxon, o que vem sendo confirmado desde então para todas as espécies do grupo de que se tem algum conhecimento sobre a história natural (KROMBEIN, 1967; CROSS *et al.*, 1975; COVILLE, 1979, 1981, 1982; COVILLE & COVILLE, 1980; COVILLE & GRISWOLD, 1984; HOOK, 1984; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; BROCKMANN, 1992; GARCIA & ADIS, 1995; COVILLE *et al.*, 2000; O'NEILL, 2001; BUSCHINI & DONATTI, 2012). O macho

guarda usualmente apresenta alto grau de devoção à fêmea com quem interage, permanecendo no ninho mesmo após a cópula, onde eventualmente também pode auxiliar a parceira em algumas atividades de nidificação, ao invés de simplesmente copular com ela e abandoná-la, como o faz a maioria dos machos de insetos (THORNHILL & ALCOCK, 1983; O'NEILL, 2001). O comportamento ímpar exibido por machos de *Trypargilum* pode ser efetivo na proteção da prole contra inimigos naturais, além de possivelmente assegurar ao macho guarda a paternidade da prole feminina (COVILLE, 1982).

O comportamento de guarda também foi registrado em outras espécies de vespas das famílias Crabronidae e Sphecidae pertencentes aos gêneros *Cerceris*, *Dynatus*, *Oxybelus*, *Pison*, *Trigonopsis* e *Trachypus* (JANVIER, 1928; TSUNEKI, 1970; PECKHAM *et al.*, 1973; WEST-EBERHARD, 1974; BOHART & MENKE, 1976; PECKHAM, 1977; ALCOCK, 1978; KIMSEY, 1978; HOOK & MATTHEWS, 1980; ANTROPOV, 1990; BANKS 1995). Segundo Alcock (1975), esse comportamento surgiu independentemente nestes gêneros, sendo derivado do hábito territorial do macho e, possivelmente, se mantém em *Trypargilum* por pressões seletivas, já que indiretamente permite que o macho copule repetidamente com sua parceira ao longo da nidificação, especialmente antes da oviposição (HOOK & MATTHEWS, 1980; COVILLE, 1982; BROCKMANN & GRAFEN, 1989).

Levando em conta as particularidades descritas acima e, uma vez que o comportamento de guarda em ninhos ativos vem se mantendo ao longo do tempo evolutivo entre os machos de *Trypargilum*, é de se esperar que tal comportamento aumente as chances de ganho em sucesso reprodutivo do macho guarda. No entanto, estudos comportamentais apontam que as fêmeas podem copular com outros machos durante a nidificação, denominados machos satélites ou patrulheiros (COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Esses achados levantam dúvidas sobre o real significado funcional do comportamento reprodutivo do macho guarda e apontam para a necessidade de estudos envolvendo análises genéticas de parentesco intranidal, para que seja possível testar a hipótese de monoginia-monoandria de casais formados durante a nidificação e, conseqüentemente, desvendar a genética resultante deste complexo sistema de acasalamento.

#### 1.4. Estudos genéticos envolvendo *Trypoxylon*

Apesar do gênero *Trypoxylon* possuir uma grande riqueza de espécies, poucos estudos genéticos foram conduzidos até então envolvendo tais espécies. Inicialmente, Metcalf *et al.* (1975) testaram 19 locos enzimáticos para *Trypoxylon (Trypargilum) politum* e detectaram que apenas 32% deles eram polimórficos, chegando a um valor de heterozigozidade média observada de 5,9%. Mesmo com o baixo polimorfismo enzimático encontrado por Metcalf *et al.* (1975), esforços no intuito de melhor entender a estrutura genética em ninhos de *Trypargilum* foram conduzidos utilizando marcadores alozímicos para algumas espécies endêmicas da região Neotropical. Peruquetti (2003) tentou estimar relações de parentesco em ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* e *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* e verificou que, em muitos casos, a paternidade da prole feminina podia ser imputada ao macho guarda. O mesmo resultado foi encontrado por Santoni (2008) estudando a genética familiar em ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons*, *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse*, *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* e *T. rogenhoferi*. Estes autores concluíram que a presença do macho guarda pode garantir a paternidade da maior parte da prole feminina nos ninhos amostrados; porém, ressaltaram a necessidade de novos estudos utilizando marcadores genéticos mais polimórficos no intuito de melhor esclarecer as relações de parentesco nessas vespas.

Os microssatélites foram introduzidos em análises de parentesco por Queller *et al.* (1993) e são considerados ideais para esse tipo de estudo, pois tratam-se de marcadores codominantes, o que permite a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos e, conseqüentemente, comparações diretas entre genótipos. Além disso, a alta taxa de mutação de locos microssatélites também é favorável para estimativas de parentesco genético, pois resulta em uma grande quantidade de alelos por loco, diminuindo as chances de dois indivíduos não relacionados compartilharem esses alelos (WEBSTER & REICHART, 2005). Considerando este fato, Almeida (2010) iniciou a prospecção de locos microssatélites para a espécie *T. albitarse* e detectou polimorfismo em quatro dentre oito locos (Talb02, Talb05, Talb06 e Talb07), os quais foram utilizados como ferramenta para determinar a

estrutura genética familiar em ninhos desta espécie, verificando que a maior parte da prole feminina poderia ser atribuída ao macho guarda em 22 ninhos desta espécie. Esse estudo representou um passo importante, pois foram os primeiros marcadores desse tipo desenvolvidos para o gênero. No entanto, estudos envolvendo mais locos e uma maior amostragem de ninhos ainda eram necessários para que uma análise genética familiar mais robusta se tornasse possível. Nesse sentido, no início do meu doutorado, desenvolvi testes adicionais, os quais permitiram detectar que três (Talb01, Talb03, Talb09) dos locos apontados por Almeida (2010) como monomórficos apresentavam polimorfismo. Além disso, a caracterização de um loco polimórfico adicional (Talb14) ampliou o número de locos utilizáveis, possibilitando que os dados relativos aos locos microssatélites por nós definidos fossem descritos em conjunto (ALMEIDA *et al.*, 2013, ver ANEXO I), e conseqüentemente, foi uma contribuição essencial para as análises genéticas desenvolvidas no presente trabalho.

Apesar de outros grupos de Hymenoptera estarem bem representados em estudos envolvendo genética de populações, especialmente abelhas e formigas, na literatura pertinente encontra-se apenas dois estudos relativos à diversidade genética e estruturação populacional de *Trypoxylon*, ambos utilizando marcadores alozímicos. Peruquetti (2003) utilizou *T. albitarse* e *T. rogenhoferi*, enquanto Santoni (2008) utilizou *T. aurifrons*, *T. nitidum* e *T. lactitarse* como material de estudo. Apesar do baixo polimorfismo encontrado por esses autores utilizando esse tipo de marcador genético, ambos concluíram que as populações analisadas estavam estruturadas e atribuíram o resultado observado ao comportamento filopátrico dessas vespas.

Por fim, destacam-se também alguns estudos citogenéticos em que a haplodiploidia foi confirmada para o grupo, o número cromossômico de algumas espécies foi determinado e algumas hipóteses de evolução cariotípica foram propostas (AMARANTE, 1991a; GOMES, 1995; GOMES, *et al.* 1995, 1997; SCHER, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2000, 2001, 2002a, 2002b; ARAÚJO, 2002, SCHER & POMPOLO, 2003; SANCHEZ & POMPOLO, 2004, MENEZES *et al.*, 2011).

## 1.5. Objetivos

Com base nas particularidades apresentadas sobre a história de vida de espécies do subgênero *Trypargilum*, este trabalho teve como objetivo geral:

◆ Contribuir para o conhecimento da história natural de *Trypoxylon* (*Trypargilum*), incluindo registros comportamentais para três espécies deste subgênero e análises genéticas de parentesco intranidal e da genética populacional de *T. albitarse*.

Dessa forma, indivíduos, grupos familiares e populações de espécies do subgênero *Trypargilum* foram utilizados como objeto de estudo, de forma a cumprir os seguintes objetivos específicos, descritos no presente estudo nos Capítulos 2, 3 e 4, respectivamente:

◆ Obter registros comportamentais em observações diretas durante a atividade de nidificação de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *agamemnon*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* em ninhos-armadilha;

◆ Determinar a estrutura genética em ninhos de *T. albitarse* e testar a hipótese de monoginia-monoandria de casais formados durante a nidificação;

◆ Determinar a diversidade e a estrutura genética de populações de *T. albitarse* coletadas em cinco localidades brasileiras.

## **CAPÍTULO 2: Atividade de nidificação de três espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Latreille, 1796 (Hymenoptera: Crabronidae), incluindo uma breve revisão sobre a literatura recente**

---

### **Resumo**

*Trypoxylon* é um gênero diverso da família Crabronidae formado por vespas solitárias caçadoras de aranhas. Algumas espécies utilizam cavidades preexistentes para nidificação, o que facilita sua amostragem e estudo através do uso de cavidades artificiais. Registros comportamentais de três espécies do subgênero *Trypargilum* (*Trypoxylon agamemnon*, *Trypoxylon aurifrons* e *Trypoxylon nitidum*) foram obtidos através de observações diretas em ninhos-armadilha instalados em duas localidades: (1) em uma área natural de Floresta Ombrófila Mista em Guarapuava, PR e (2) em um ambiente sob ação antrópica, o *campus* da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. A marcação de espécimes permitiu o monitoramento de casais durante o trabalho a campo e possibilitou a obtenção de registros do comportamento de nidificação das espécies em questão. Como em outras espécies do subgênero *Trypargilum*, os machos foram devotos às fêmeas com quem formaram par ao longo da nidificação. No período em que a fêmea esteve ausente caçando presas ou coletando material para a construção das divisórias de barro, o macho guarda permaneceu no ninho, protegendo-o contra intrusos e inimigos naturais. Foi possível obter informações sobre o comportamento reprodutivo, incluindo a descrição de repertórios exibidos durante a cópula e oviposição nas três espécies estudadas.

**Palavras-chave:** vespas solitárias, macho guarda, comportamento, ninhos-armadilha.

## 2.1. Introdução

O gênero *Trypoxylon* apresenta ampla distribuição geográfica e agrupa 634 espécies divididas entre os subgêneros *Trypoxylon* e *Trypargilum*, sendo este último restrito ao Novo Mundo e menos diverso, com 88 espécies (PULAWSKI, 2013). Fêmeas de *Trypargilum* são solitárias e nidificam em cavidades compridas e estreitas, que podem ser preexistentes ou construídas com barro, onde células de cria linearmente dispostas e separadas por paredes de barro são aprovisionadas com aranhas paralisadas (COVILLE & COVILLE, 1980). No decorrer da nidificação, machos desse subgênero exibem o comportamento de guarda, evitando ataques de parasitoides, predadores ou competidores intraespecíficos (BROCKMANN, 1980). Usualmente a fêmea é receptiva a cópulas repetidas com o macho guarda, as quais ocorrem especialmente antes da oviposição (COVILLE 1982; BROCKMANN & GRAFEN, 1989).

Apesar da presença constante do guarda no ninho durante o aprovisionamento do ninho, a fêmea é receptiva a cópulas extrapar com outros machos, denominados patrulheiros ou satélites, o que coloca em dúvida o sucesso reprodutivo da tática comportamental adotada pelo macho guarda (COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; BUSCHINI & DONATTI, 2012).

O fato de espécies de *Trypargilum* nidificarem em cavidades preexistentes tem facilitado o estudo dessas vespas, pois fêmeas são atraídas a nidificar em ninhos-armadilha (COVILLE & COVILLE, 1980; GARCIA & ADIS, 1995). Até então poucas espécies do grupo foram estudadas detalhadamente sob a óptica comportamental. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi obter registros do comportamento de nidificação e reprodutivo, através de observações diretas em ninhos-armadilha, utilizando como objeto de estudo três espécies Neotropicais: *T. agamemnon*, *T. aurifrons* e *T. nitidum*.

## 2.2. Material e Métodos

Dados sobre o comportamento de nidificação de *T. agamemnon* foram obtidos no Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava, PR (25° 23' S, 51° 27' W) com o uso de ninhos-armadilha confeccionados com madeira, medindo 2,5x2x12 cm, furados longitudinalmente a uma profundidade de 8 cm, com os diâmetros de 0,5, 0,7, 1,0 ou 1,3 cm. As armadilhas foram cortadas longitudinalmente e unidas com fita adesiva, o que permitiu que fossem abertos para a investigação cuidadosa do seu conteúdo quando necessário. Os ninhos-armadilha foram distribuídos no interior da mata sobre estacas a 150 cm de altura (Figura 1A), em 12 sítios com 16 ninhos cada (quatro de cada diâmetro dispostos aleatoriamente), totalizando 192 ninhos-armadilha, que foram inspecionadas, pelo menos, quatro vezes por semana entre novembro de 2009 e março de 2010, período do ano em que estudos prévios constataram que *T. agamemnon* apresenta intensa atividade de nidificação nesta localidade (BUSCHINI & FARJADO, 2010; BUSCHINI & BERGAMASCHI, *in press*).

Outro local de amostragem foi estabelecido em uma área sob ação antrópica, o *campus* da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em São Carlos, SP (22° 01' S, 47° 53' W), onde foi possível obter dados comportamentais para as espécies *T. aurifrons* e *T. nitidum*. Os ninhos-armadilha utilizados para amostragem nesta área foram confeccionados com gomos de bambu seco, com diâmetros e comprimentos variáveis, também cortados longitudinalmente e unidos com fita adesiva. Vinte e dois blocos com oito ninhos-armadilha presos por um elástico (totalizando 176 armadilhas) foram colocados horizontalmente em áreas cobertas (Figura 1B). De acordo com Santoni (2008), tais espécies apresentaram atividade de nidificação durante o ano todo nesta região, razão pela qual os ninhos-armadilha foram inspecionados para a obtenção de dados pelo menos duas vezes por semana ao longo de um ano (março de 2010 a março de 2011).

Machos e fêmeas das três espécies em questão foram observados durante a nidificação e seu comportamento registrado *ad libitum* (ALTMANN, 1974) nas duas localidades, totalizando aproximadamente 350 horas de observação. Casais em nidificação foram marcados com tinta atóxica no mesoscuto, através de sua imobilização com o auxílio de sacos plásticos transparentes cortados em uma das

extremidades (Figura 2). A combinação de diferentes cores e posições permitiu a identificação de cada indivíduo no campo e o monitoramento dos casais durante o processo de nidificação. Quando possível, um otoscópio foi utilizado para facilitar a observação das vespas no interior dos ninhos.

Em ambas as localidades, os ninhos ocupados e finalizados foram substituídos por vazios e levados ao laboratório, onde foram abertos para a investigação cuidadosa do seu conteúdo. Em seguida, os imaturos foram mantidos em temperatura ambiente até completar o seu desenvolvimento e a emergência como adultos. Alguns adultos foram estocados a  $-20^{\circ}$  C, enquanto outros foram soltos no ambiente em que foram coletados.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Aspectos gerais observados para as três espécies

Fêmeas de *T. agamemnon*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* foram observadas visitando várias cavidades disponíveis antes de escolher um local propício para fundar um ninho. O aprovisionamento se deu somente após formarem par com um macho guarda, o qual foi devoto à fêmea com quem interagiu, pois raramente saiu do ninho durante o aprovisionamento, ficando a maior parte do tempo posicionado internamente, próximo à sua entrada, eventualmente projetando a cabeça e/ou antenas para fora enquanto a fêmea estava ausente. Além da função de guarda do ninho, machos também foram observados pressionando as presas no fundo de células em aprovisionamento, após a saída da parceira para uma nova viagem de forrageio.

A marcação de espécimes permitiu observar que, muitas vezes, o mesmo macho acompanhou a construção do ninho todo (n=11). Somente as fêmeas foram observadas ocupando o ninho no período noturno; o macho se ausentava no fim da tarde, após sua parceira cessar o aprovisionamento, e usualmente retornava na manhã seguinte.

Foi possível constatar, tanto diretamente durante o trabalho a campo, quanto indiretamente, observando internamente os ninhos no laboratório, que as fêmeas realizaram um depósito inicial de barro no fundo da cavidade antes de iniciarem o aprovisionamento.

A atividade de nidificação foi contínua durante o dia. As fêmeas iniciavam suas atividades pela manhã após a chegada do parceiro; porém, em dias de chuva, cerração, nevoeiro e baixa temperatura, o casal permanecia dentro do ninho e as fêmeas retardavam suas atividades, realizando voos somente quando as condições ambientais estavam propícias.

Machos foram retirados de ninhos ativos durante o trabalho a campo para marcações. Apesar de serem capturados logo após a saída da fêmea, marcados com tinta atóxica e liberados em poucos minutos, antes mesmo do retorno de sua parceira, os machos não retornavam ao ninho imediatamente após a marcação; ao contrário, ficavam fora por algum tempo e retornavam, em média, 40 minutos após o processo de marcação (n=10). Antes de retomar a posição de guarda, faziam voos

de inspeção ao redor da entrada da cavidade por até três minutos. Nos casos em que a fêmea chegou antes do retorno do macho, cessou temporariamente o provisionamento e permaneceu guardando o ninho até o retorno do parceiro.

Além da remoção para marcações, machos também foram removidos de seus ninhos experimentalmente por um longo período de tempo, no intuito de avaliar se a fêmea apresentaria atividade de nidificação na sua ausência. Um macho de *T. agamemnon*, e dois de *T. aurifrons* e *T. nitidum* foram capturados no início da tarde em ninhos ativos e liberados somente no fim do dia. Fêmeas das três espécies não apresentaram atividade de nidificação sem a presença do parceiro no ninho, permanecendo em sua guarda a tarde toda.

Em geral, as fêmeas não tiveram dificuldades para reencontrar sua cavidade em provisionamento após viagens de forrageio ou coleta de barro. Porém, em algumas ocasiões foi possível notar que, durante sua chegada, fêmeas pousaram na entrada de ninhos-armadilha vizinhos, mas afastaram-se em seguida até reconhecerem o próprio ninho. Macho e fêmea que formavam um casal foram capazes de se reconhecer, através de um ritual tocando as antenas mutuamente, logo após a chegada do(a) parceiro(a). Na chegada da fêmea, após o ritual de reconhecimento mútuo na entrada do ninho, o macho saía da cavidade e subia sobre o corpo da parceira (Figura 3A). As cópulas observadas ocorreram sempre neste momento, fora do ninho. Após a cópula, ou nos casos em que a cópula não ocorreu, a fêmea entrou no ninho e o macho imediatamente a acompanhou até a célula em provisionamento.

O mecanismo de oviposição foi semelhante nas três espécies e ocorreu logo após a acomodação da última aranha estocada em cada célula. Após a oviposição, as células foram fechadas com uma parede de barro trazido pela fêmea e moldada com as mandíbulas, produzindo um som característico, provavelmente originado por vibrações da musculatura do mesossoma. A finalização dos ninhos se deu com uma camada de barro mais espessa que as demais, ou com uma série de duas ou três paredes finas justapostas (células de fechamento). Usualmente, essa última camada foi construída rente à entrada da cavidade, e nessa fase o macho já não foi mais observado acompanhando a fêmea construtora.

Diferenças comportamentais interespecíficas foram observadas e são apresentadas a seguir.

### 2.3.2. *Trypoxylon agamemnon*

Dentre os quatro diâmetros disponíveis nas armadilhas, *T. agamemnon* nidificou apenas no tubo de menor diâmetro oferecido (0,5 cm). Ao longo de quatro meses foi possível acompanhar o provisionamento de 12 ninhos, totalizando 90 horas de observação para esta espécie. O tempo médio para coleta de barro foi de, aproximadamente, 5 minutos (n=23) e para a construção da parede de barro 57 minutos, sendo, em média, realizadas 6,3 viagens para coleta de barro em cada partição (n=2). O tempo médio gasto para a caça de presas foi de, aproximadamente, 48 minutos (n=28) e para o provisionamento de uma célula, 6 horas e 40 minutos (n=4).

Fêmeas foram observadas constantemente inspecionando cavidades vazias (Figura 3A), e uma delas foi seguida por um macho com quem formou par e iniciou um novo ninho. Cópulas foram observadas fora do ninho, logo após a chegada da fêmea, momentos antes da oviposição (n=2) ou durante outras etapas da nidificação (n=5), com duração média de cinco segundos. Duas cópulas extrapar foram observadas e em ambas a fêmea foi receptiva. O macho patrulheiro ficou posicionado próximo à entrada do ninho à espera da fêmea, saltou sobre seu corpo assim que ela pousou e copularam rapidamente. Em ambos os casos, o macho guarda não esboçou reação alguma diante da receptividade da parceira a cópulas extrapar e permaneceu tomando conta do ninho até o final de sua construção. Após a cópula com o patrulheiro, essas fêmeas fizeram um voo curto e, antes de entrar em seu ninho e continuar a nidificação, copularam novamente, desta vez com o macho residente.

Foram registradas duas oviposições de fêmeas distintas, porém ambas exibiram um repertório comportamental muito semelhante. Quando a fêmea chegou com a última aranha, uma cópula com o macho guarda foi observada. Em seguida, entrou no ninho para acomodar a presa e saiu para um voo curto. Ao retornar, pressionou as presas no fundo da célula, saiu do ninho e entrou novamente com o abdômen direcionado para a célula, sempre sendo seguida pelo macho guarda. A oviposição ocorreu nesse momento e durou, aproximadamente, um minuto nas duas observações. Após a postura, o macho saiu do ninho para um voo curto e a fêmea permaneceu como guarda até o seu retorno.

Durante as observações, foi visto que uma fêmea coespecífica, que não a marcada como parceira de um guarda, tentando entrar com uma aranha em um ninho ativo. Após o toque de antenas mútuo, o macho guarda repeliu a fêmea intrusa emitindo um forte ruído, impedindo sua entrada. Não foi constatada a troca de macho guarda durante o aprovisionamento dos ninhos desta espécie.

Tentativas de ataque de inimigos naturais não foram registradas durante as observações nos ninhos de *T. agamemnon*; porém, no laboratório, foi possível constatar que uma célula em um de 12 ninhos amostrados foi parasitada por uma espécie da família Chrysididae.

### 2.3.3. *Trypoxylon aurifrons*

Vinte e dois ninhos da espécie foram monitorados ao longo de um ano, totalizando 150 horas de observação. Fêmeas demoraram, em média, oito minutos (n=47) para coletar barro e uma hora e doze minutos para a construção da parede de barro (n=6), sendo realizadas 5,2 viagens para cada parede. Para a coleta de presas, fêmeas desta espécie gastaram, em média, 39 minutos (n=54) e para o aprovisionamento de uma célula 5 horas e 30 minutos (n=8).

Uma fêmea marcada foi acompanhada por até dois dias em fase de seleção de cavidades, inspecionando várias armadilhas em blocos diferentes antes de fundar um ninho. Foi possível registrar como se deu a formação de três casais. A fêmea ao inspecionar orifícios disponíveis, entrou em uma armadilha ocupada por um macho coespecífico. Ambos permaneceram no seu interior por alguns minutos e, em seguida, a fêmea iniciou a nidificação com coletas de barro para um depósito inicial no fundo da cavidade. Um macho foi observado por dois dias posicionado internamente próximo à entrada de uma cavidade vazia. Dois machos foram observados disputando um ninho-armadilha vazio por mais de uma hora, até que um deles desistiu da luta, deixando a cavidade disponível para o rival, que permaneceu no seu interior após o conflito. Três dias após o registro desse conflito, a cavidade em questão estava ocupada por um casal.

As cópulas foram observadas fora do ninho, logo após a chegada da fêmea, tendo duração média de quatro segundos (n=13) e, usualmente foram registradas antes da oviposição (n=6 cópulas, n=8 oviposições observadas), que se deu de forma muito semelhante ao observado para *T. agagemnon*.

Foram registradas seis tentativas de cópula extrapar com machos patrulheiros, três delas bem sucedidas. Nas três tentativas em que houve cópula extrapar, a fêmea foi receptiva ao patrulheiro e o macho guarda permaneceu no ninho sem esboçar nenhuma reação agonística. Assim como observado em *T. agagemnon*, após a cópula extrapar, essas fêmeas realizaram um voo de curta duração, retornaram e copularam com o residente antes de retomar o processo de nidificação. Nas outras três em que o patrulheiro não foi bem sucedido, o guarda

reagiu voando rapidamente em direção ao patrulheiro assim que ele se posicionou sobre sua parceira, que estava pousada próxima à entrada do ninho. Em seguida, os dois caíram ao chão durante um combate, que se estendeu por até dois minutos. Imediatamente após a luta, o macho guarda retornou ao ninho, onde permaneceu com a fêmea por alguns minutos até que ela saísse novamente para retomar a atividade de nidificação.

O acompanhamento de espécimes marcados permitiu registrar que a fêmea trocou de parceiro uma (n=1), duas (n=3) ou até três vezes (n=1) durante o provisionamento do mesmo ninho, indicando que é possível que haja desalojamento do macho residente após combate com o patrulheiro em ninhos dessa espécie. Um dos machos marcados e observado como patrulheiro foi visto na posição de guarda após duas semanas, evidenciando que as duas estratégias reprodutivas coexistem ao longo da vida do mesmo macho.

Em um dos dois ninhos de *T. aurifrons* em que foi realizada a remoção experimental do macho guarda ao longo de uma tarde, a fêmea foi receptiva a outro macho, que tomou a posição de guarda, enquanto o macho guarda original estava preso devido à manipulação experimental. O macho guarda original foi solto próximo à entrada do seu ninho ao final da tarde; porém, ao se aproximar e detectar que havia outro macho ocupando seu lugar, não esboçou tentativa alguma de entrar novamente na cavidade que ocupava.

Foram observadas tentativas de ataques de parasitoides da família Chrysididae (n=3) e Ichneumonidae (n=1) em ninhos ativos. No entanto, estes parasitoides foram efetivamente repelidos pelo macho guarda, que emitiu um forte ruído e ameaçou atacar as fêmeas intrusas com as mandíbulas. Todas as tentativas de invasão registradas foram mal sucedidas e duraram menos de um minuto. Apesar disso, indiretamente, através do acompanhamento dos 22 ninhos amostrados desta espécie em laboratório, foi possível constatar que três células haviam sido atacadas por fêmeas de Chrysididae.

#### 2.3.4. *Trypoxylon nitidum*

A nidificação de 16 ninhos de *T. nitidum* foi acompanhada ao longo de 110 horas de observação em São Carlos. Fêmeas demoraram, em média, aproximadamente seis minutos para coleta de barro e 6,6 viagens e 44 minutos para terminar cada parede de barro. Gastaram em média 55 minutos na coleta de presas (n=23) e, aproximadamente, 4 horas para a provisão de uma célula inteira (n=3).

Assim como observado para *T. agamemnon*, as fêmeas foram observadas repetidamente entrando e saindo de cavidades disponíveis para fundar um novo ninho, até serem seguidas por um macho coespecífico, com quem formaram par após a seleção de um local propício para nidificar (n=2).

Dentre as vespas marcadas neste estudo, apenas um macho de *T. nitidum* não retornou ao ninho após o processo de marcação. A fêmea deste ninho permaneceu na posição de guarda até o dia seguinte, quando ainda na parte da manhã foi observada realizando duas saídas rápidas do ninho, das quais voltou sem barro ou aranha. Em seguida ovipositou, fechou a célula e a entrada do ninho, que até então contava apenas uma célula provisionada.

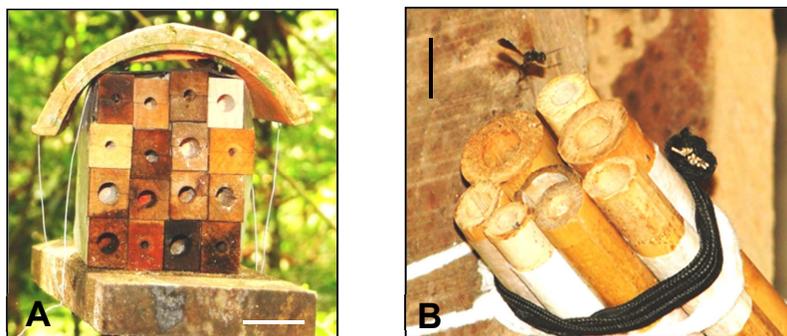
Durante o provisionamento, no momento em que a fêmea retornava ao ninho, foi possível observar que o macho, ao sair do ninho, se posicionou sobre o corpo da parceira e tentou copular (n=9); porém, em quase todas essas tentativas, a fêmea não esboçou receptividade para se acasalar com o macho guarda, e entrou no ninho imediatamente. Apenas uma cópula foi observada para *T. nitidum* durante o trabalho a campo, a qual ocorreu durante o provisionamento da primeira célula de um ninho e teve a duração de 4 segundos. O repertório comportamental de oviposição foi semelhante ao observado para *T. agamemnon* e *T. aurifrons*, porém não foi precedido de cópula.

Durante as observações, apenas um macho patrulheiro foi visto próximo a um ninho ativo, permanecendo no local por menos de três minutos, indo embora antes mesmo da chegada da fêmea. Ao contrário do verificado em *T. agamemnon* e *T. aurifrons*, não foram observadas disputas entre residente e patrulheiro em *T.*

*nitidum*. Dentre os ninhos com espécimes marcados, em apenas um houve uma troca de macho ao longo do aprovisionamento.

Em dois dos ninhos amostrados, a última camada de barro foi construída a mais de 10 cm da entrada, permitindo que houvesse espaço suficiente para que o macho permanecesse acompanhando a fêmea até a etapa de finalização do ninho, se posicionando fora da cavidade enquanto ela distribuía o barro para a construção da parede final.

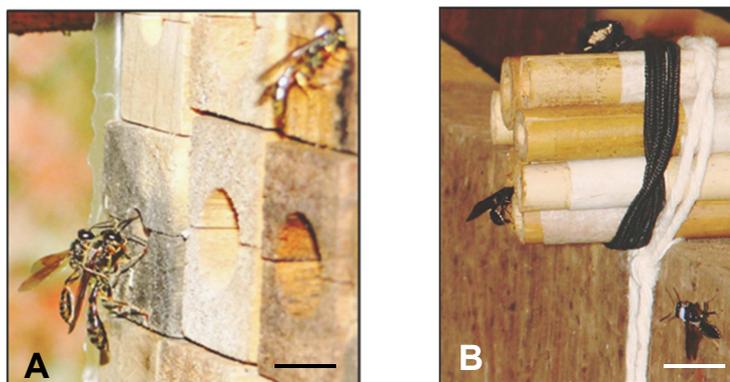
Fêmeas de Chrysididae foram observadas constantemente molestando o macho guarda na entrada do ninho em tentativas de ataque que duraram, em média, 50 segundos (n=9). Essas tentativas de invasão não foram bem sucedidas, exceto em um ninho que estava sem o macho guarda em virtude de sua remoção experimental. Nesse caso, como a fêmea residente ainda não havia voltado do forrageio e o ninho se encontrava desprotegido, a fêmea parasitóide, ao se aproximar e perceber que se tratava de um ninho ativo, adentrou o ninho e ovipositou na célula em aprovisionamento em menos de um minuto.



**Figura 1.** **A.** Bloco contendo ninhos-armadilha confeccionados com madeira instalados no Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava, PR. **B.** Bloco contendo ninhos-armadilha confeccionados com gomos de bambu seco, colocados em regiões cobertas do *campus* da UFSCar, São Carlos, SP. Escala: 10 mm. Fotos: Antonio C. B. Bergamaschi.



**Figura 2.** Espécimes de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) marcados com tinta atóxica durante as observações a campo. Escala: 10 mm. Fotos: Antonio C. B. Bergamaschi.



**Figura 3.** **A.** No canto superior direito, uma fêmea de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *agememnon* entrando em uma cavidade vazia ao inspecionar ninhos candidados para iniciar a fundação; no canto inferior esquerdo, um casal desta espécie em nidificação, com o macho posicionado sobre o corpo da fêmea, antes de entrarem no ninho-armadilha. **B.** Macho patrulheiro de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aurifrons* posicionado próximo à entrada de um ninho ativo no momento em que a fêmea chegou do forrageio, pouco antes de uma tentativa de cópula extrapar. Escala: 10 mm. Fotos: Antonio C. B. Bergamaschi.

## 2.4. Discussão e breve revisão da literatura recente

O comportamento de guarda é generalizado em espécies do subgênero *Trypargilum*, embora variações intraespecíficas sejam detectadas (RICHARDS, 1934). Em *Trypargilum*, esse comportamento provavelmente é derivado de um ancestral comum, cujo hábito territorial do macho, ao defender uma determinada área contra competidores coespecíficos, certamente contribuiu também para redução do impacto de inimigos naturais (ALCOCK, 1975; ALCOCK, 1978; COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989). É provável que o hábito territorial de machos esteja fortemente ligado à receptividade da fêmea a cópulas durante toda a vida adulta (ALCOCK, 1978; THORNHILL & ALCOCK, 1983; HOOK & MATTHEWS, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989).

Embora represente um grupo interessante para estudos comportamentais, devido à facilidade em nidificar em ninhos artificiais e pela peculiaridade do comportamento de macho guarda compartilhado por todas as espécies de *Trypargilum*, até o momento poucas espécies foram estudadas sob a óptica comportamental. Ao todo, apenas sete espécies foram objeto de estudos comportamentais detalhados: (1) *Trypoxylon (Trypargilum) tenoctilan* (COVILLE & COVILLE, 1980), (2) *T. politum* (BROCKMANN & GRAFEN, 1989, CROSS *et al.*, 1975), (3) *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (BROCKMANN, 1992), (4) *T. albitarse* (AMARANTE, 1991a; ALMEIDA, 2010), (5) *T. rogenhoferi* (GARCIA & ADIS, 1995), (6) *Trypoxylon (Trypargilum) vagulum* (COVILLE *et al.*, 2000) e (7) *T. agamemnon* (BUSCHINI & DONATTI, 2012).

A maior parte dos repertórios comportamentais observados para *T. agamemnon*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* foi relatada em estudos prévios que incluíam estas ou outras espécies de *Trypargilum*; porém, algumas particularidades foram encontradas. Espécies deste subgênero exibem diferenças pronunciadas em caracteres comportamentais e seu comportamento de nidificação apresenta variações como resultado de estratégias alternativas de nidificação (KROMBEIN, 1967; AMARANTE, 1991a).

Existe uma grande variação na forma de seleção de cavidades ou locais para construir tubos de barro; porém, na maioria dos casos, as fêmeas parecem ser responsáveis pela seleção do local onde será fundado o ninho. Em espécies do grupo *albitarse*, o ninho é fundado em um local determinado pela fêmea, onde o macho pode se estabelecer na fase de construção ou após a finalização do tubo de barro, durante a ausência da fêmea construtora, ou pode segui-la até o tubo no momento em que ela está em viagens para coleta de barro (CROSS, *et al.* 1975; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; BROCKMANN, 1992). Entre as espécies que nidificam em cavidades preexistentes, a situação mais comum parece ser semelhante à observada para as espécies do presente estudo, onde ao entrar e sair repetidamente de orifícios candidatos a um novo ninho, a fêmea é seguida pelo macho, ou o encontra ocupando uma cavidade, e pode se acasalar com o novo parceiro antes ou logo após o início do aprovisionamento (COVILLE, 1981, 1982; COVILLE *et al.*, 2000; BUSCHINI & DONATTI, 2012). COVILLE *et al.* (2000) observaram até dois machos de *T. vagulum* seguindo uma fêmea no momento em que ela estava inspecionando cavidades disponíveis para uma fundação. A formação de casais de *T. aurifrons* se deu após a fêmea encontrar o macho em uma cavidade disponível, o que até então havia sido relatado somente em *T. rogenhoferi* (GARCIA & ADIS, 1995). Ademais, dois machos de *T. aurifrons* foram observados lutando por uma cavidade vazia por mais de uma hora. Machos de *T. agamemnon* foram observados por BUSCHINI & DONATTI (2012) ocupando cavidades vazias por até sete dias. HOOK (1984) relatou machos de *Trypoxylon (Trypargilum) spinosum* inspecionando cavidades vazias, porém não conseguiu registrar em seu trabalho como se deu a associação de casais. Esses achados fornecem evidências de que possivelmente as fêmeas, ao inspecionar cavidades vazias, deixem estímulos químicos capazes de atrair parceiros coespecíficos antes de iniciar a nidificação.

O hábito de depositar uma porção de barro no fundo da cavidade antes de iniciar o aprovisionamento do ninho com presas também foi relatado em outros estudos envolvendo espécies de *Trypargilum* (COVILLE & GRISWOLD, 1984; GENARO, 1996; COVILLE *et al.*, 2000; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Segundo Krombein (1967), este hábito pode estar ligado à proteção contra rugosidade ou presença de fibras no fundo da cavidade que poderiam eventualmente machucar o

imaturo. Alguns estudos sugerem que este comportamento também está ligado à utilização do barro pelo imaturo para a confecção do pupário (CROSS *et al.*, 1975; COVILLE & GRISWOLD, 1984; GARCIA & ADIS, 1995; COVILLE *et al.*, 2000).

Coville *et al.* (2000) registraram fêmeas de *T. vagulum* reutilizando barro proveniente de tubos construídos por outras espécies, principalmente *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) *fabricator*, regurgitando água sob paredes de ninhos antigos com material seco e solidificado e, em seguida, transportando-o para o seu próprio ninho no intuito de moldar divisórias. Em São Carlos, fêmeas de *T. aurifrons* e *T. nitidum* foram observadas regularmente inspecionando tubos de barro construídos por *T. albitarse*, localizados próximos ao seu sítio de nidificação, ou até mesmo reutilizando ninhos antigos desta espécie; porém, ao contrário de *T. vagulum*, não foram observadas coletando barro desta fonte.

Casais das espécies do presente estudo pareceram ser capazes de se reconhecer durante a nidificação, sempre exibindo um ritual de toques de antenas mútuos quando um dos dois chegava ao ninho. Esse comportamento também foi relatado em estudos prévios (RAU, 1928; COVILLE & COVILLE, 1980; COVILLE, 1981). Na literatura, há relatos que sugerem que o reconhecimento entre macho e fêmea esteja associado a estímulos químicos percebidos pelos toques de antenas (AMARANTE, 1991a; COVILLE & COVILLE, 1980). No presente trabalho, o comportamento observado do macho guarda de *T. agagemnon* expulsando uma fêmea intrusa coespecífica sugere que macho e fêmea que formam um casal são capazes de se reconhecer. Esse repertório também foi relatado para *T. albitarse*, *T. rogenhoferi*, *T. tenocitlan* e *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *clavatum* (ALMEIDA, 2010; COVILLE, 1982; GARCIA & ADIS, 1995), porém não foi registrado por Buschini & Donatti (2012) também estudando o comportamento de *T. agagemnon*. Brockmann (1980) caracterizou o parasitismo intraespecífico na forma de usurpação e/ou provisionamento de ninhos por fêmeas coespecíficas como uma prática comum em *T. politum*, sendo o macho guarda receptivo a ambas durante a nidificação.

O macho guarda de *T. agagemnon*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* se posiciona dentro da cavidade, próximo ao seu orifício de entrada, assim como registrado para *T. albitarse* (AMARANTE, 1991a), *T. politum* (BROCKMANN & GRAFEN, 1989), *T. spinosum* (HOOK, 1984), *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *subimpressum* (GENARO *et al.*,

1989), *T. monteverdeae* (BROCKMANN, 1992) e *T. vagulum* (COVILLE *et al.*, 2000). O contrário foi observado em espécies como *T. rogenhoferi* (GARCIA & ADIS, 1995), *T. tenocitlan* (COVILLE & COVILLE, 1980) e *T. lactitarse* (MOREIRA, 2007; BUSCHINI, M.L.T. informação pessoal), nas quais o macho permanece com maior frequência no interior do ninho, em frente à célula em provisionamento. Garcia & Adis (1995) relataram que a permanência do macho guarda de *T. rogenhoferi* na entrada do ninho geralmente é de curta duração e sugeriram que este comportamento esteja relacionado à detecção da presença de parasitoides próximos ao ninho, por meio de estímulos químicos.

O macho guarda das espécies deste estudo, assim como relatado previamente para *T. agamemnon*, *T. albitarse*, *Trypoxylon (Trypargilum) collinum*, *T. monteverdeae*, *T. politum*, *T. tenocitlan* e *Trypoxylon (Trypargilum) tridentatum* (RAU & RAU, 1916; RAU 1928; BRUCH, 1932; PECKHAM & PECKHAM, 1895; RAU, 1928; PAETZEL, 1973; COVILLE & COVILLE, 1980; CROSS *et al.*, 1975; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; BROCKMANN, 1992; ALMEIDA, 2010; BUSCHINI & DONATTI, 2012) foi observado exibindo formas de cuidado paternal, auxiliando a fêmea em algumas atividades da nidificação, tais como: auxílio com as presas na entrada do ninho, disposição das aranhas no fundo da célula, ou alisando as paredes de barro recém construídas pela parceira. Garcia & Adis (1995) observaram um macho de *T. rogenhoferi* puxando uma presa colocada propositalmente próxima à entrada de seu ninho. Segundo Coville & Coville (1980), a ajuda do macho durante a nidificação permite que a fêmea permaneça menos tempo no ninho e mais tempo forrageando, conseqüentemente aumentando a eficiência no provisionamento.

Na maior parte das espécies estudadas, assim como nas do presente estudo, foi possível constatar que o macho raramente saiu do ninho durante o provisionamento e, quando o fez, abandonou-o por poucos minutos apenas no intuito de expulsar parasitoides, interagir com outros machos ou em voos curtos nas proximidades (CROSS *et al.*, 1975; COVILLE & COVILLE, 1980; COVILLE & GRISWOLD, 1984; GARCIA & ADIS, 1995; COVILLE, *et al.* 2000; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Coville & Griswold (1984) observaram que machos de *Trypoxylon (Trypargilum) superbum* continuam guardando o ninho por mais de uma semana

após sua finalização, sendo este comportamento efetivo principalmente contra o ataque de formigas forrageadoras.

Alguns estudos apontaram que em algumas espécies a fêmea não nidifica na ausência do parceiro, pois permaneceram na posição de guarda até o retorno do macho guarda ao ninho (CROSS *et al.*, 1975; COVILLE & COVILLE, 1980; COVILLE & GRISWOLD, 1984; COVILLE *et al.*, 2000; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Entretanto, alguns achados para outras espécies apontaram a presença facultativa do macho guarda no ninho e da aparente dependência das fêmeas em relação presença constante do parceiro durante a nidificação. Hartman (1905) e Kurczewski (1963) relataram que ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) texense* podem ser facultativamente guardados pelo macho durante o provisionamento. Garcia & Adis (1995) registraram que uma fêmea de *T. rogenhoferi* provisionou a primeira célula de um ninho de forma independente e formou par com o macho guarda somente durante a construção da segunda célula. Ao contrário do observado no presente trabalho, Brockmann & Grafen (1989) removeram o macho guarda experimentalmente e constataram que fêmeas de *T. politum* continuam nidificando na sua ausência; aproximadamente 13% das células desse estudo foram provisionadas pelas fêmeas independentemente; porém, estes autores relataram que em ninhos não assistidos pelo macho guarda, a fêmea permaneceu mais tempo no ninho entre as viagens de coleta de material, conseqüentemente diminuindo a eficiência no provisionamento e aumento da taxa de parasitismo.

Assim como constatado para *T. aurifrons* e *T. nitidum*, o comportamento de guarda em outras espécies parece ser efetivo na defesa contra ataques de parasitoides das famílias Chrysididae, Ichneumonidae e Formicidae, pois em situações de ataque os machos usualmente esboçam reações agonísticas, podendo emitir fortes ruídos, se lançar para fora do ninho ou combater o inimigo natural utilizando as mandíbulas (RAU & RAU, 1916; KROMBEIN, 1967; CROSS *et al.*, 1975; COVILLE & COVILLE, 1980; COVILLE, 1982; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; BROCKMANN, 1992; O'NEIL, 2001; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Em contrapartida, inimigos naturais podem apresentar respostas à defesa do ninho interposta pelo macho guarda adotando estratégias alternativas para atacar seus hospedeiros, como por exemplo: (1) vespas Chrysididae, que foram observadas atacando ninhos assistidos pelo macho de *T. agamemnon*,

passando por cima dele sem nenhuma dificuldade e ovipositando na célula em provisionamento (BUSCHINI & DONATTI, 2012); (2) fêmeas de Chrysididae que perfuraram a parede de ninhos recém-finalizados, ou aguardavam nas proximidades para ovipositar quando o ninho estivesse desprotegido (GARCIA & ADIS, 1995); (3) vespas da família Chalcididae pertencentes ao gênero *Melittobia* que podem atacar ninhos já finalizados (BROCKMANN & GRAFEN, 1989) e, (4) fêmeas de dípteros da família Sarcophagidae que foram observadas depositando seus ovos na entrada do ninho hospedeiro, e após a eclosão, suas larvas foram capazes de se deslocar até as células provisionadas (KROMBEIN, 1967; CROSS *et al.*, 1975). Peckham (1977) demonstrou que a presença do macho guarda em vespas esfecídeas do gênero *Oxybelus* aumentou significativamente a sobrevivência da prole. Nesse sentido, apesar das estratégias apresentadas pelos parasitoides, é provável que isso também se aplique a ninhos guardados por machos de *Trypargilum*.

Machos de *T. agamemnon*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* não estiveram presentes no ninho durante o período noturno, porém retornaram na manhã seguinte, retomando o posto de guarda. Embora esse comportamento também tenha sido relatado previamente por Buschini & Donatti (2012) em *T. agamemnon*, há relatos da presença facultativa do macho guarda no ninho durante o período noturno em *T. monteverdeae*, *T. politum*, *T. ribrocinctum*, *T. spinosum*, *T. tenocitlan* e *T. vagulum* (LIN, 1969; PAETZEL, 1973; COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; BROCKMANN, 1992; COVILLE *et al.*, 2000). BROCKMANN (1992) registrou brigas noturnas entre a fêmea construtora e o macho guarda de *T. monteverdeae*, disputando a ocupação do ninho neste período, relatando ainda que a fêmea pode construir um tubo de barro exclusivamente para o parceiro pernoitar próximo ao ninho em provisionamento.

O comportamento de nidificação de *T. nitidum* também foi estudado por Coville (1981) e Moreira (2007). Apesar da presença constante do macho durante a nidificação, nesses estudos cópulas não foram registradas, ao contrário do presente estudo, onde foi possível observar uma cópula para esta espécie. Coville *et al.* (2000), após observarem o provisionamento de dez células do início à finalização, somado a inúmeras observações esparsas, também apontaram a ausência de cópulas para *T. vagulum* durante a nidificação, apesar da presença constante do macho guarda no ninho. Moreira (2007) acompanhou o provisionamento de quatro

ninhos de *T. nitidum* e relatou que o macho guarda deixou o ninho muitas vezes por longos períodos de tempo. Diferentemente, em nossas observações, o macho de *T. nitidum* raramente saiu do ninho durante o aprovisionamento e, nas manipulações experimentais, foi possível detectar que, ao removê-lo do ninho, as fêmeas cessaram o aprovisionamento e permaneceram nestes até o retorno do parceiro. A única cópula registrada para a espécie ocorreu durante o aprovisionamento da primeira célula de um ninho, a qual foi a única célula inicial acompanhada desde o início até a finalização, sugerindo que casais da espécie copulam antes mesmo da fundação do ninho, ou nos estágios iniciais do aprovisionamento.

Estudos envolvendo marcação e recaptura de espécimes apontam estimativas de longevidade variáveis entre as espécies. Buschini & Donatti (2012) observaram machos marcados de *T. agamemnon* por mais de um ano e fêmeas por até 10 meses, enquanto Coville & Coville (1980) estimaram um tempo mínimo de um mês para *T. tenoxtitlan*. Amarante (1991a) pode observar um macho marcado por 42 dias e Brockmann & Gragen (1992) apontaram que adultos de *T. politum* vivem no máximo um mês. No presente estudo, ninhos de *T. agamemnon* foram acompanhados por apenas quatro meses, impossibilitando corroborar os achados de Buschini & Donatti (2012). Adicionalmente, tanto em Guarapuava quanto em São Carlos, a maior parte dos adultos foi capturada e levada ao laboratório após a finalização dos ninhos, dificultando estimativas de longevidade baseadas em espécimes marcados.

A arquitetura dos ninhos obtidos no presente estudo não foi descrita em detalhes, pois pouco diferiu da observada em estudos prévios envolvendo as mesmas espécies (BUSCHINI & FARJADO, 2010; SANTONI & DEL LAMA, 2007; SANTONI, 2008) e, de fato, foi relativamente semelhante a das outras espécies estudadas do grupo *nitidum*, no qual, de acordo com Coville (1982), encontra-se a maior diversidade de espécies de *Trypargilum*. Outros estudos também constataram que a camada de barro construída para o fechamento do ninho é mais espessa em espécies de *Trypargilum* (KROMBEIN, 1967; MATTEWS & MATTEWS, 1968; COVILLE, 1979, 1981; GARCIA & ADIS, 1995; COVILLE *et al.*, 2000; SANTONI & DEL LAMA, 2007). Embora a maioria dos ninhos acompanhados tenha sido finalizada com a camada de barro rente à entrada do orifício, em dois ninhos de *T. nitidum* a camada de barro final foi construída internamente, a mais de 1 cm de sua

entrada, permitindo a presença do macho nessa etapa da nidificação. Ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) xatandrum* e *T. superbum* são sempre finalizados no interior da cavidade, a mais de 1 cm do orifício de entrada (COVILLE & GRISWOLD, 1983, 1984). Coville *et al.* (2000) registraram um entre 176 ninhos de *T. vagulum* com a parede final a 5 cm da entrada. De acordo com Coville & Griswold (1983), isso pode ser uma vantagem, pois a camada final não recebe a ação direta da chuva; por outro lado, possibilita que outra espécie nidifique no espaço disponível, prejudicando ou dificultando a saída de indivíduos que passam para a fase adulta.

Segundo Krombein (1967), a preferência por nidificação em cavidades de determinado diâmetro é função do tamanho do corpo da vespa, onde cada espécie tem um limite aceitável para nidificação imposto pelo tamanho do corpo. Em ninhos com diâmetro reduzido, onde não há espaço suficiente para que macho e fêmea possam passar um pelo outro internamente, o macho sai do ninho momentaneamente logo após a fêmea pousar, sobe sobre o corpo dela e, em seguida, ela entra no tubo acompanhada pelo parceiro (COVILLE *et al.*, 2000). As cópulas registradas no presente trabalho em *T. agamemnon*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* ocorreram neste momento (fora do ninho, antes da entrada do casal). Em seguida, a fêmea foi observada entrando no ninho, imediatamente seguida pelo seu parceiro. Repertórios muito semelhantes também foram observados por Rau (1928), Coville (1981), Hook (1984) e Buschini & Donatti (2012). Em contrapartida, algumas espécies que usualmente nidificam em tubos com diâmetros maiores como *T. albitarse* (AMARANTE, 1991a; ALMEIDA, 2010), *T. tenoctlan* (COVILLE & COVILLE, 1980), *T. politum* (BROCKMANN & GRAFEN, 1989), *T. monteverdeae* (BROCKMANN, 1992), *T. rogenhoferi* (GARCIA & ADIS, 1995) e *T. lactitarse* (COVILLE *et al.*, 2000; MOREIRA, 2007; BUSCHINI M.L.T. comunicação pessoal), o macho usualmente permanece dentro do ninho após a chegada da fêmea, que entra na cavidade passando por cima do parceiro, o qual imediatamente se vira e a segue até a célula em provisionamento, onde usualmente cópulas foram registradas ao longo da nidificação. Em espécies que constroem tubos de barro, como *T. albitarse* e *T. politum*, cópulas foram registradas repetidamente durante a construção e expansão de tubos de barro, antes da oviposição, e após viagens de forrageio ou coleta de barro (BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; ALMEIDA, 2010).

O repertório de cópula seguida de oviposição parece ser semelhante na maioria das espécies. Neste momento, a fêmea se mostra mais receptiva ao macho que em outras ocasiões, e o macho se torna sexualmente agressivo, podendo segurar a fêmea por alguns instantes, ou permanece constantemente tocando a parceira com as antenas e /ou peças bucais (BROCKMANN & GRAFEN, 1989; BROCKMANN, 1982; AMARANTE, 1991a; COVILLE *et al.*, 2000; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Após o término do aprovisionamento, a fêmea pode imediatamente por um ovo no abdômen de uma das aranhas ou deixar o ninho por alguns minutos e voltar quando estiver pronta para ovipositar (COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN, 1992; GARCIA & ADIS, 1995; COVILLE *et al.*, 2000; BUSCHINI & DONATTI, 2012).

Um aspecto relevante que deve ser levado em conta, pois coloca em dúvida o sucesso da estratégia reprodutiva adotada pelo macho guarda é o fato de que as fêmeas também podem copular com outros machos presentes na área de nidificação, sendo estes denominados machos patrulheiros (GARCIA & ADIS, 1995; MOLUMBY, 1997; PERUQUETTI & DEL LAMA, 2003). Durante as observações das atividades de nidificação foi possível registrar a presença constante de machos patrulhando ninhos de *T. agamemnon* e *T. aurifrons*. Geralmente o patrulheiro permaneceu posicionado próximo à entrada de ninhos ativos, já assistidos por um macho guarda e tentou copular assim que a fêmea pousou na entrada do ninho. Relatos semelhantes sobre a receptividade da fêmea a cópulas com machos patrulheiros também foram obtidos previamente em *T. agamemnon*, *T. albitarse*, *T. politum*, *T. rogenhoferi* e *T. tenocitlan*, (RAU, 1928; KROMBEIN, 1967; COVILLE & COVILLE, 1980; HOOK, 1984; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE 1991a; GARCIA & ADIS, 1995; BROCKMANN, 1992; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Diante da receptividade da parceira a cópulas extrapar, o macho guarda pode reagir e defender o ninho ativamente contra o rival (RAU, 1928; CROSS *et al.*, 1975; COVILLE & COVILLE, 1980; COVILLE, 1982; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; GARCIA & ADIS, 1995; BUSCHINI & DONATTI, 2012), ou não esboçar reação alguma (AMARANTE, 1991a; GARCIA & ADIS, 1995; BUSCHINI & DONATTI, 2012), assim como relatado no presente estudo. Tal como observado neste trabalho para *T. agamemnon* e *T. aurifrons*, GARCIA & ADIS (1995) e BUSCHINI & DONATTI (2012), estudando *T. rogenhoferi*, *T. albitarse* e *T.*

*agamemnon*, respectivamente, também afirmaram que nas observações em que houve cópula extrapar, a fêmea geralmente copulou com o macho guarda logo em seguida e, provavelmente, esse repertório comportamental esteja associado ao aumento da garantia de paternidade do macho guarda.

Um ponto chave para entender o comportamento singular de guarda exibido em *Trypargilum* reside na hipótese de que haja uma forma de competição espermática nestas espécies (BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a), que ocorre quando os espermatozoides de dois ou mais machos é depositado na espermateca e utilizado de maneira não aleatória pela fêmea (PARKER, 1970; SMITH, 1979; THORNHILL & ALCOCK, 1983). Isso pode ser um importante fator nesse contexto, visto que mesmo que registros apontem que a fêmea copula com o patrulheiro, o último a copular antes da oviposição geralmente leva vantagem na fertilização dos óvulos (HOOK & MATTEWS, 1980; PARKER, 1984; HUNTER *et al.*, 1993).

Assim como observado para *T. nitidum*, Coville *et al.* (2000) também não relataram conflitos entre macho guarda e patrulheiros de *T. vagulum* durante suas observações. Por outro lado, Brockmann (1992) observou constantemente conflitos entre o macho guarda e o patrulheiro de *T. monteverdeae*, um deles por mais de 90 minutos. Brockmann & Grafen (1989) registraram combates mais curtos de, aproximadamente, 3 minutos entre machos, porém mais severos, visto que uma das lutas registradas levou à morte de um dos competidores. Alguns registros apontam que, após conflito entre macho guarda e patrulheiro em *T. agamemnon*, *T. albitarse*, *T. lactitarse*, *T. politum*, *T. rogenhoferi* e *T. tenocitlan*, o residente foi desalojado e o rival tomou o posto de macho guarda (COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; BROCKMANN, 1992; AMARANTE, 1991a; GARCIA & ADIS, 1995; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Assim como relatado aqui para *T. aurifrons*, Buschini & Donatti (2012) registraram mediante experimentos de marcação e recaptura que as estratégias de guarda e patrulheiro podem coexistir ao longo da vida de machos de *T. agamemnon*. Diante disso, é possível que os machos alternem as duas estratégias reprodutivas conforme a disponibilidade de fêmeas em nidificação e ainda não assistidas por um macho guarda.

Moreira (2007), estudando comparativamente a morfologia do aparelho reprodutor feminino de *Trypoxylon s. str.* e *Trypargilum*, constatou que a espermateca em espécies de *Trypargilum* é vestigial, comparada à de *Trypoxylon s. str.*. Isso evidencia que fêmeas de *Trypargilum* precisam copular antes da oviposição para gerar filhas, fator que demanda a dependência de presença constante do macho guarda durante o processo de nidificação. Novos estudos relativos à morfologia do aparelho reprodutor dessas fêmeas podem fornecer informações adicionais valiosas a respeito de possíveis mecanismos de competição e precedência espermática.

A alta frequência de cópulas, registrada em diversas espécies de *Trypargilum* durante a nidificação (COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; BROCKMANN, 1992; BUSCHINI & DONATTI, 2012), pode acarretar em custos para ambos os sexos, além de levantar a questão de como esses indivíduos se beneficiariam por copular repetidamente com o mesmo par. A função primária da cópula para os machos em geral é garantir descendentes, podendo assim aumentar suas chances de sucesso reprodutivo ao copularem com muitas fêmeas (DARWIN, 1871; TRIVERS, 1972), enquanto que para as fêmeas, a função primária da cópula é a fertilização dos seus óvulos, ou seja, se uma cópula é suficiente para suas inseminações, não haveria motivos para cópulas adicionais (DALY, 1978; PARKER, 1979). Diante disso, os interesses de machos e fêmeas na cópula parecem ser assimétricos.

Segundo Alcock (1991), o comportamento de guarda pode evoluir em um determinado táxon somente quando os benefícios reprodutivos obtidos são maiores que os custos. Para os machos, o comportamento de guarda requer o investimento de tempo e energia em uma única fêmea, mas em contrapartida lhe oferece algumas vantagens como: (1) a chance de defender seu território e evitar que machos rivais copulem com a fêmea que interage e (2) a receptividade da fêmea nidificadora em cópulas momentos antes da oviposição, aumentando suas chances de sucesso reprodutivo. Para as fêmeas, cópulas repetidas representam um alto gasto energético, além de lhes aumentar as chances de predação e/ou aquisição de doenças (DALY, 1978; THORNHILL & ALCOCK, 1983; LEWIS JR, 1987). No entanto, apesar desses custos potenciais, fêmeas de *Trypargilum* copulam muitas vezes ao longo da vida. Acredita-se que esse processo indiretamente possa ser um

incentivo dado pela fêmea para que o macho guarda permaneça no ninho durante todo o processo de nidificação (AMARANTE, 1991a; MOLUMBY, 1997), o que, em contrapartida, também confere a ela algumas vantagens adaptativas, tais como: (1) proteção contra inimigos naturais enquanto coleta barro ou caça presas (2) ajuda do parceiro em algumas etapas da nidificação, (3) aumento na eficiência de caça e provisionamento, por permanecer menos tempo no ninho e mais tempo forrageando (BROCKMANN, 1988).

Os resultados verificados aqui para *T. agamemnon*, *T. aurifrons* e *T. nitidum*, associado ao exposto na breve discussão sobre a literatura recente envolvendo o comportamento de *Trypargilum*, apontam que espécies desse subgênero exibem estratégias comportamentais variadas. Por esta razão, outras espécies merecem atenção em novos estudos comportamentais, os quais poderão efetivamente contribuir para estabelecer a origem do comportamento de macho guarda e as possíveis pressões seletivas responsáveis pela sua origem e manutenção. Aliado a isso, estudos morfológicos do aparelho reprodutor, envolvendo o mecanismo de competição espermática, associados a estudos genéticos de parentesco intranidal, podem contribuir para testar a hipótese de monoginia-monoandria entre macho guarda e fêmea construtora, além de permitir elucidar o significado da presença constante do macho em ninhos de *Trypargilum*.

### **CAPÍTULO 3: Estrutura genética em ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae)**

---

#### **Resumo**

*Trypoxylon (Trypargilum)* constitui um grupo de vespas solitárias em que o macho apresenta comportamento de guarda em ninhos ativos, o que representa uma estratégia reprodutiva incomum a dos demais insetos, pois forma par com uma fêmea, com a qual geralmente copula repetidas vezes ao longo da nidificação, especialmente antes da oviposição. É de se esperar que esse comportamento aumente as chances de ganho no sucesso reprodutivo do macho guarda; porém, a existência de uma tática reprodutiva alternativa, a do macho patrulheiro, associada à receptividade das fêmeas a cópulas extrapar, coloca em dúvida a efetividade da estratégia adotada pelo macho guarda. O objetivo deste trabalho foi avaliar mediante análises genéticas se o comportamento de guarda exibido por machos da espécie *Trypoxylon albitarse* lhes garante a paternidade da prole feminina. Oito locos microssatélites espécie específicos foram utilizados para genotipar 367 indivíduos, provenientes de 29 ninhos físicos com, pelo menos, sete indivíduos, constituindo grupos de progênie e fêmea construtora (n=3), progênie e macho guarda (n=1), progênie e os dois supostos parentais (n=3) ou apenas a progênie (n=22 ninhos). Os resultados demonstraram que a prole de 12 ninhos analisados pode ser atribuída a um único casal (monoginia-monoandria). Foi possível constatar ainda nas análises genéticas troca sequencial de pai, mãe e casal ao longo da nidificação, indicando que os 29 ninhos físicos amostrados, na verdade, representavam 35 ninhos genéticos ou grupos familiares. Aproximadamente, 9% da prole feminina resultou de cópulas extrapar, sugerindo que apesar do comportamento promíscuo apresentado pela fêmea, *T. albitarse* possui um sistema genético de acasalamento predominantemente monogâmico.

**Palavras chave:** *Trypoxylon*, macho guarda, paternidade, microssatélites.

### 3.1. Introdução

*Trypoxylon* é o gênero mais diverso da família Crabronidae, constituído por vespas solitárias caçadoras de aranhas, em que a fêmea exibe cuidado maternal na forma de construção e aprovisionamento dos ninhos, onde os imaturos se desenvolvem até o estágio adulto (COVILLE, 1982). O gênero é dividido em dois subgêneros: *Trypoxylon* e *Trypargilum* (RICHARDS, 1934; COVILLE, 1982).

Todas as espécies de *Trypargilum* de que se tem algum conhecimento sobre a história natural possuem ninhos guardados por um macho na fase de aprovisionamento (RICHARDS, 1934; COVILLE, 1982; BROCKMANN & GRAFEN, 1989). Fêmeas desse táxon se beneficiam com a guarda do ninho pelo parceiro, pois têm mais tempo livre para forragear. (BROCKMANN & GRAFEN, 1989). Esse investimento paternal não é comum entre os Hymenoptera, assim como nos demais insetos (EVANS & WEST-EBERHARD, 1970; WILSON, 1971; BOHART & MENKE, 1976; CAMERON, 1986), mas já foi registrado isoladamente em outras espécies de vespas das famílias Crabronidae e Sphecidae (JANVIER, 1928; TSUNEKI, 1970; PECKHAM *et al.*, 1973; WEST-EBERHARD, 1974; BOHART & MENKE, 1976; PECKHAM, 1977; ALCOCK, 1978; KIMSEY, 1978; HOOK & MATTHEWS, 1980; ANTROPOV, 1990; BANKS 1995) em besouros da família Staphylinidae (ALCOCK, 1991).

Teoricamente o macho guarda de *Trypargilum* poderia monopolizar a fêmea com a qual interage, pois raramente se ausenta do ninho, especialmente na fase final do aprovisionamento de cada célula de cria, quando usualmente ocorre uma cópula seguida de oviposição (COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; BROCKMANN, 1992; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Por outro lado, machos deste subgênero podem exibir uma tática reprodutiva alternativa, sendo denominados patrulheiros ou satélites, pois patrulham ninhos ativos constantemente em busca de cópulas com fêmeas que já estão acompanhadas por um macho guarda (COVILLE & COVILLE, 1980; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; BROCKMANN, 1992; BUSCHINI & DONATTI, 2012). BUSCHINI & DONATTI (2012), estudando o comportamento de *Trypoxylon agamemnon* no sul do Brasil, mediante experimentos de marcação e recaptura, constataram que um macho pode exibir as duas táticas reprodutivas ao longo da vida.

A receptividade das fêmeas a cópulas com machos patrulheiros levanta dúvidas sobre a efetividade da estratégia reprodutiva adotada pelo macho guarda e o real significado deste traço comportamental compartilhado por diversas espécies (BROCKMANN & GRAFEN, 1989). Nesse sentido, esforços foram realizados no intuito de determinar a estrutura genética intranidal em *Trypargilum*. Inicialmente, utilizando marcadores alozímicos, foram estabelecidas as relações de parentesco em ninhos de *T. albitarse* e *T. rogenhoferi* por Peruquetti (2003) e de *T. aurifrons*, *T. nitidum*, *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi* por Santoni (2008). Estes dois autores concluíram que a presença do macho guarda parece lhe garantir a paternidade da prole feminina, porém o baixo polimorfismo encontrado nos marcadores aloenzimáticos evidenciou a necessidade de novos estudos, utilizando marcadores mais polimórficos. No intuito de esclarecer melhor a estrutura sociogenética intranidal nessas vespas, Almeida (2010) utilizou quatro locos microssatélites espécie específicos no intuito de determinar a estrutura familiar em ninhos de *T. albitarse*. Este autor, também verificou que o macho guarda foi o presumido pai responsável pela maior parte da prole feminina. No entanto, estudos envolvendo um número maior de locos e maior amostragem de ninhos ainda se faziam necessários para a obtenção de resultados mais conclusivos. Nesse sentido, mediante análises genéticas com a utilização de oito locos microssatélites, o objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura genética em ninhos físicos de *T. albitarse* e testar a hipótese de monoginia-monoandria de casais formados durante a nidificação.

## 3.2. Material e Métodos

### 3.2.1. Aspectos relevantes sobre a espécie *Trypoxylon albitarse* e seu comportamento

*Trypoxylon albitarse*, assim como as demais espécies do grupo *albitarse*, nidifica em tubos de barro construídos pela fêmea, os quais possuem uma aparência rugosa devido à forma com que o barro é aplicado, formando cristas na forma de “V” invertido (Figura 1). Os ninhos geralmente são construídos em superfícies verticais abrigadas da chuva, com a entrada voltada para o solo e são muito comuns em paredes de residências ou edifícios localizados nas proximidades de parques ou bosques (AMARANTE, 1991a). Detalhes sobre a biologia de nidificação da espécie podem ser encontrados em Brunch (1932), Rau (1933), Fritz & Genise (1980), Amarante (1991a) e Almeida (2010).

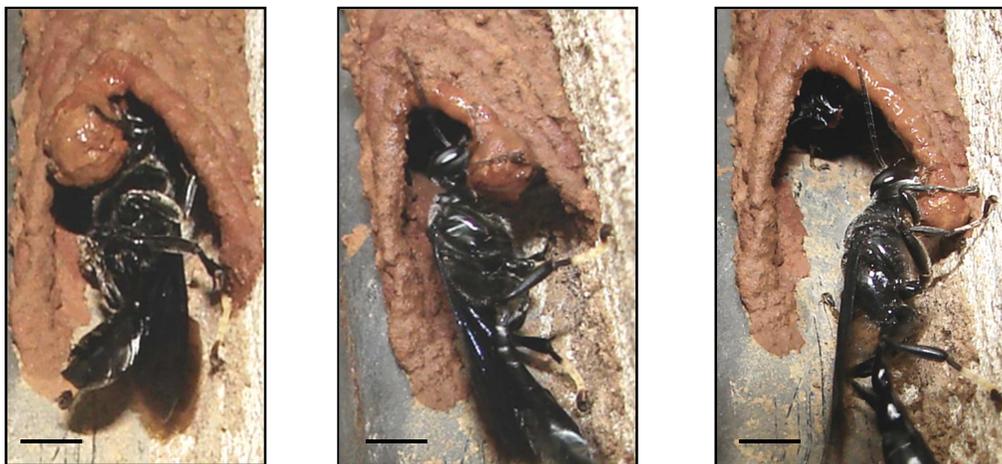
Aspectos importantes sobre o comportamento de nidificação e reprodutivo de *T. albitarse* foram obtidos por Amarante (1991a) e Almeida (2010). Esses autores relataram que a fêmea inspecionou muitos locais antes de selecionar um sítio apropriado para fundar um ninho. Durante a construção do tubo de barro, a presença do macho guarda foi facultativa, mas ao iniciar o provisionamento das células de cria com aranhas, o macho esteve constantemente presente no ninho. Quando a fêmea voltava ao ninho e se aproximava da sua entrada, o casal se tocava mutuamente com as antenas, o macho guarda saía do tubo para que a fêmea entrasse com presa ou barro, e entrava novamente seguindo sua parceira. Machos desta espécie exibiram formas de cuidado paternal, pois foram observados moldando o barro aplicado pela fêmea durante a construção ou expansão do tubo de barro e pressionando as aranhas no fundo da célula de cria após a partida dela para uma nova viagem de forrageio. Cópulas entre macho guarda e a fêmea construtora foram registradas ao longo de todo o processo de nidificação, especialmente antes da oviposição, dentro do tubo, exceto na célula final da nidificação, quando não havia mais espaço suficiente para copularem no seu interior. As cópulas registradas antes da oviposição foram mais longas do que as registradas em outros momentos do provisionamento. Depois da oviposição, a fêmea coletou barro para fechar a célula de cria e então passou a suprir a próxima célula até a finalização do ninho, eventualmente estendendo o comprimento do tubo

ao longo do processo de nidificação. Machos patrulheiros também foram observados posicionados próximos à entrada de ninhos ativos esperando pela chegada da fêmea, momento em que cópulas extrapar foram registradas por Amarante (1991a). Diante da presença constante do patrulheiro e da receptividade da parceira a cópula extrapar, o macho guarda reagiu de duas formas: (1) defendeu seu território reprodutivo repelindo ativamente o rival ou (2) não esboçou reação alguma e permaneceu guardando o ninho até sua finalização.

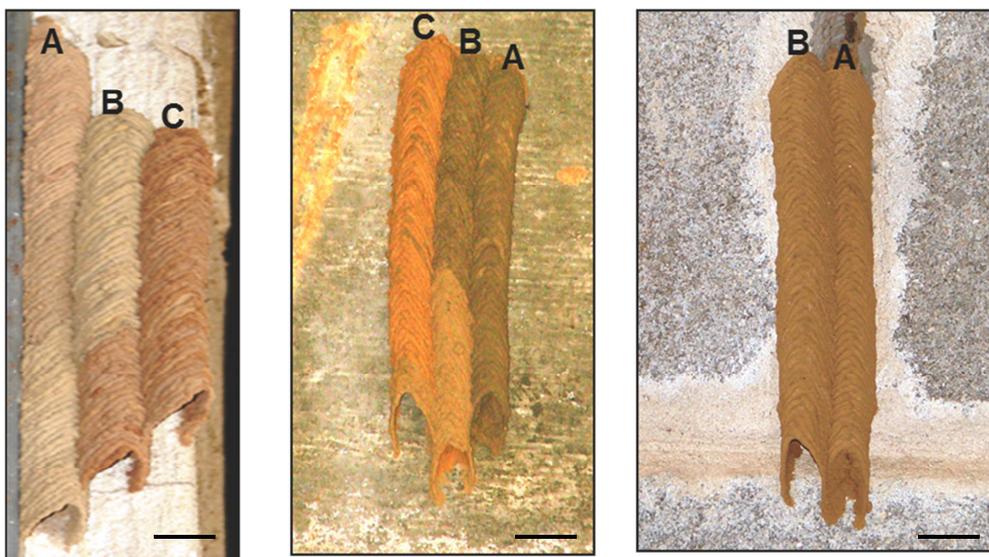
### 3.2.2. Áreas de estudo e trabalho a campo

O trabalho a campo foi conduzido entre 2005 e 2012, permitindo a coleta de ninhos de *T. albitarse* em seis localidades: (1) *campus* da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e áreas ao seu redor em São Carlos, SP (22° 01'S, 47° 53'W); (2) *campus* da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em Araras, SP (22° 18'S, 47° 22'W); (3) Fazenda Angelim Rainforest em Ubatuba, SP (23° 23'S, 45° 03'W); (4) Fazenda Santo Antônio em Duartina, SP (22° 24'S, 49° 24'W); (5) *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, MG (20° 47'S, 42° 52'W) e (6) *campus* da Universidade Estadual Santa Cruz (UESC) em Ilhéus, BA (14° 38'S, 39° 06'W).

Após a localização dos ninhos em paredes de construções humanas, foram cuidadosamente abertos com o auxílio de uma pinça de ponta fina. Caso verificada a presença de imaturos na fase de pupa, os casulos foram coletados e colocados em tubos plásticos individuais. Cada conjunto de tubos construídos paralelamente foi considerado como um ninho físico durante a amostragem e, *a priori*, considerado também um grupo familiar nas análises genéticas. Os espécimes foram devidamente identificados pela localidade, número do ninho, tubo e célula dos quais foram retirados. A construção justaposta dos tubos de barro, utilizando parte da parede do tubo construído anteriormente na construção de um novo, permitiu inferir a ordem de construção dos tubos de cada ninho físico amostrado (Figura 2). Em seguida, os imaturos foram levados ao laboratório e mantidos à temperatura ambiente até atingirem o estágio adulto, momento em que foi possível determinar o sexo e, em seguida, estocar as amostras a -20°C para a posterior extração do DNA. Quando possível, o casal em nidificação (candidatos a parentais), a fêmea construtora ou o macho guarda também foram coletados.



**Figura 1.** Fêmea de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* distribuindo o barro na construção de um tubo, formando cristas na forma de “V” invertido. Escala: 12 mm. (Fotos: Juliano C. Almeida).



**Figura 2.** Exemplos de ninhos físicos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. A sequência em que os tubos de barro foram construídos (representada pelas letras A, B ou C) foi inferida graças à sua disposição justaposta, utilizando parte da parede do tubo construído anteriormente na construção de um novo. Escala: 15 mm. (Fotos: Antonio C. B. Bergamaschi).

### 3.2.3. Análises genéticas por locos microssatélites

O DNA total foi extraído e isolado a partir da maceração do mesossoma ou de pernas de espécimes adultos, utilizando protocolos de extração com fenol-clorofórmio (FERNANDES-SALOMÃO, *et al.* 2005) ou Chelex (WASH, *et al.* 1991). Nove locos microssatélites espécie específicos prospectados e caracterizados por Almeida *et al.* (2013) foram incluídos nas genotipagens (Talb01, Talb02, Talb03, Talb05, Talb06, Talb07, Talb09, Talb12, Talb14). As reações de PCR foram realizadas utilizando 250  $\mu$ M de cada dNTP, 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 1.0  $\mu$ M de cada *primer*, 1  $\times$  tampão BioTools e 1 U de *Taq* DNA polimerase (BioTools, Madri, Espanha), totalizando um volume final de 10  $\mu$ L. A amplificação se deu em termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) envolvendo os seguintes passos: um passo inicial de desnaturação a 94°C por três minutos, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 20 segundos na temperatura de hibridização específica para cada loco indicada por Almeida *et al.* (2013), e um minuto a 72°C (extensão). A reação foi finalizada com um passo final de extensão a 70°C por 10 minutos.

A genotipagem se deu através de corridas em sequenciador automático MegaBace-1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O tamanho dos alelos foi obtido pela leitura dos picos de genotipagem no programa MegaBace Fragment Profiler versão 1.2 (GE Healthcare), os quais foram comparados com os picos exibidos pelo marcador de tamanho ET550R.

No intuito de aumentar a confiabilidade da genotipagem, aproximadamente 25% dos espécimes foram retipados, especialmente os oriundos de ninhos físicos onde foram detectados mais de um pai, mais de uma mãe ou machos diploides. Esse cuidado metodológico, associado à amplificação bem sucedida dos machos amostrados e à baixa taxa de machos diploides encontrada nas genotipagens, tornou desnecessária a utilização de métodos de correção e detecção de alelos nulos usualmente empregados em análises envolvendo marcadores microssatélites.

Inicialmente, um teste de atribuição foi realizado utilizando o programa GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2006) no intuito de estimar a probabilidade de cada espécime ser atribuído ao seu ninho de origem e, conseqüentemente, estimar a confiabilidade dos marcadores genéticos utilizados nas análises. Tal como em outros himenópteros, o sistema de determinação do sexo em *T. albitarse* é

haplodiplóide, com machos haploides e fêmeas diploides. O programa GenAlex 6.5 não distingue indivíduos haploides e diploides em uma mesma base de dados; então, a população de fêmeas foi duplicada e os machos considerados homocigotos nessa análise, no intuito de conservar as proporções alélicas. Apesar de subestimar a população de machos, o teste de atribuição é baseado em frequências alélicas, então este viés não foi relevante para o resultado obtido.

A estrutura genética nos ninhos amostrados pode ser detectada através da análise comparativa da segregação mendeliana dos genótipos da prole e, quando possível, dos candidatos a parentais. Este método foi facilitado pelo sistema haplodiplóide de determinação sexual, pois através dos genótipos da prole masculina foi possível reconstruir o genótipo materno e, pela verificação do alelo comum às filhas ou “irmãs completas”, detectar o alelo paterno. No intuito de evitar erros na reconstrução dos genótipos parentais, foram incluídos na análise apenas ninhos com mais de sete indivíduos genotipados.

Adicionalmente, o programa Kingroup 2 (KONOVALOV, *et al.* 2004) foi utilizado no intuito de corroborar os resultados obtidos na análise comparativa da segregação mendeliana para os 19 ninhos amostrados em São Carlos. Este programa usa estimativa por máxima verossimilhança e, a partir de dados de marcadores codominantes por meio de simulações, estima a probabilidade ( $P$ ) de pares de indivíduos de um mesmo grupo definido previamente (ninhos físicos) compartilharem alelos por descendência, a partir de uma determinada hipótese de relacionamento (ex.: irmãos completos). Esse cálculo é baseado na abordagem descrita por Goodnight & Queller (1999), sendo realizado por meio de uma série de simulações, que se inicia com a escolha do genótipo de um indivíduo ao acaso e o cálculo da probabilidade deste indivíduo apresentar um determinado alelo com base nas frequências alélicas estimadas previamente a partir de uma população de referência (37 fêmeas de ninhos distintos). Em seguida, a simulação faz o mesmo com o genótipo de um segundo indivíduo e testa a hipótese de relacionamento (definida previamente) entre esses indivíduos. As hipóteses consideradas pelo programa Kingroup 2 no presente estudo foram definidas como: hipótese nula ( $H_0$ ) a existência de parentesco (irmãos completos ou prole e parental) entre o par de indivíduos provenientes de um mesmo ninho físico, e hipótese alternativa ( $H_1$ ) o não relacionamento genético entre esses indivíduos. Os testes foram conduzidos com 100.000 simulações pareadas. Por possuir uma opção para teste de hipóteses com

“relacionamentos complexos”, este programa permite calcular estimativas de relacionamento genético entre fêmeas diploides e machos haploides.

### 3.3. Resultados

Vinte e nove ninhos físicos de *T. albifarsa* com, pelo menos, sete espécimes disponíveis para tipagem foram utilizados nas análises, com o intuito de determinar sua estrutura genética. Assim, 367 vespas foram genotipadas (193 fêmeas, 174 machos), implicando em um valor médio de aproximadamente 12 indivíduos por ninho. O loco Talb12 não apresentou polimorfismo e foi removido da base de dados final, que contou com oito locos. Em vinte e um ninhos, foi possível a genotipagem apenas da prole, enquanto que em dois foi tipado também o macho guarda (suposto pai), em três a fêmea nidificadora (suposta mãe) e em três, os dois parentais candidatos, além da prole.

O teste de atribuição indicou que 90% dos espécimes analisados foram considerados como pertencentes ao seu ninho original. Um teste de atribuição alternativo foi realizado excluindo os espécimes em que a segregação mendeliana apontou não serem irmãos completos dos demais indivíduos do mesmo ninho como resultado de cópula extrapar ou usurpação de ninho por fêmeas coespecíficas, aumentando para 92% a porcentagem de espécimes atribuídos ao seu ninho original. Este resultado indicou alta confiabilidade nos marcadores genéticos utilizados nas análises de parentesco.

A análise comparativa da segregação mendeliana dos indivíduos de cada ninho físico amostrado, considerados *a priori* como famílias, permitiu a caracterização de cinco situações distintas: (1) em 12 ninhos foi possível detectar casos de monoginia-monoandria, pois toda a prole foi atribuída a um único casal (ver Apêndice 2); (2) em 16 ninhos, foi constatada a possível presença de mais de um pai para explicar o genótipo das filhas (ver Apêndice 3), nos quais 21,6% do total da prole feminina foi considerada como filha de um segundo, ou eventualmente um terceiro pai; (3) ao observar a posição das células em que essas filhas foram retiradas, foi possível detectar que, em dez ninhos possivelmente houve troca sequencial de macho guarda, ou seja, outro macho assumiu a função de guarda e foi responsável pela prole da(s) última(s) célula(s) do ninho físico (ver Apêndice 4). Vale ressaltar que, ao diferenciar cópula extrapar e troca sequencial de parceiro e, excluir da análise as filhas supostamente resultantes do macho guarda, a proporção de filhas originadas por cópula extrapar reduziu de 21,6% para 9,1%; (4) em sete ninhos parte da prole foi atribuída a mais de uma mãe, representando 7,3% da prole

total (ver Apêndice 5); (5) ao verificar a posição dos tubos e células da prole resultante de outra mãe, foi possível constatar evidências de que em parte não se tratava de usurpação de ninhos por fêmea intrusa, e sim de troca sequencial de fêmea nidificadora (ver Apêndice 4), o que fez com que a proporção da prole resultante de usurpação de ninhos caísse para 3,08%. A Tabela 1 fornece um breve resumo das informações sobre a estrutura genética obtida a partir dos ninhos amostrados. Ali, é apresentado o número mínimo de mães e pais que justificam a segregação mendeliana encontrada em cada ninho.

A verificação de troca sequencial de macho guarda, da fêmea construtora ou até mesmo de ambos os parentais indicou que os 29 ninhos amostrados continham, na verdade, 35 grupos familiares.

Os resultados genéticos obtidos em alguns ninhos apresentaram algumas particularidades interessantes que, por sua vez, refletem situações que ocorrem durante o provisionamento dos ninhos: (1) no ninho SC163 foram amostrados indivíduos retirados de sete tubos de barro e, nos cinco primeiros foi detectada estrutura genética simples (apenas um pai e uma mãe); porém, nos dois últimos tubos, duas mães intercalaram a prole com um segundo pai (que não o dos tubos anteriores), evidenciando não só a troca sequencial de macho guarda, mas também que este macho foi receptivo a duas parceiras durante a nidificação; (2) no ninho SC157 (ver Apêndice V), constituído por três tubos de barro, uma segunda mãe foi responsável pela prole das células finais dos dois últimos tubos e um único macho foi o pai neste ninho, indicando que provavelmente essa segunda mãe expandiu ou utilizou espaço livre no tubo construído pela outra fêmea e formou par com o macho que estava guardando o ninho anteriormente; (3) no ninho SC151, um segundo casal foi responsável pela prole presente em um tubo localizado entre dois tubos de outra mãe, indicando que a construção e provisionamento de um mesmo ninho físico pode se dar ao mesmo tempo em tubos diferentes por casais independentes.

O programa Kingroup 2 mostrou-se uma ferramenta útil para corroborar os dados da estrutura genética nos ninhos em que foi constatada monoandria-monoginia e ninhos cuja paternidade da prole feminina foi atribuída a mais de um pai (ver ANEXOS II, III e IV). No entanto, em ninhos em que foi possível constatar mais de uma mãe responsável pela prole, o programa apresentou valores de  $P$  divergentes do observado na análise comparativa da segregação mendeliana dos genótipos (ver ANEXOS V e VI). Com base nos resultados inconclusivos obtidos

com o uso deste *software*, os dados obtidos por esta análise não foram levados em conta no presente estudo.

Cinco machos diploides foram detectados de um total de 172 machos genotipados; estes machos foram observados em dois dos 29 ninhos analisados.

**Tabela 1:** Sumário da estrutura genética de 29 ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* coletados em seis localidades brasileiras.

Ninho	Fêmea Nidificadora	Macho guarda	Número de filhas	Número de filhos	Número de mães	Número de pais	Proporção de filhas atribuídas a outro(s) pai(s)	Proporção da prole atribuída à outra(s) mãe(s)
SC13			6	4	1	1		
SC16			5	5	1	2	1/5	
SC17			8	2	2	2	1/8	1/10
SC33			5	4	1	2	2/5	
SC109	X	X	3	2	1	2	1/3	
SC124		X	2	4	1	1		
SC133	X	X	9	13	1	2	3/9	
SC142	X		5	7	1	2	3/5	
SC145			6	5	1	1		
SC148			6	5	1	1		
SC151			6	11	2	5	1/6, 1/6, 1/6	3/17
SC153			8	10	1	2	2/8	
SC154			11	9	1	1		
SC157			5	4	2	1		4/9
SC158			4	11	1	2	2/4	
SC159			10	10	1	4	2/10, 1/10, 1/10	
SC160			4	10	2	3	1/4	1/14
SC163			15	8	2	4	2/15, 3/15, 6/15	4/23
SC166	X	X	8	5	3	2	1/8	4/13, 1/13
ARR1			3	12	2	2	1/3	8/13
ARR13			10	5	1	1		
ARR18			7	2	1	1		
UBA6			6	6	1	1		
DUA3			10	1	1	1		
VIC2			7	3	1	3	1/7, 2/7	
VIC11			4	5	1	1		
VIC12	X		6	0	1	1		
VIC25	X		4	4	1	1		
ILH2			4	3	1	3	1/4, 1/4	
<b>TOTAL</b>			187	167			16 ninhos 41/187 (21,9%)*	7 ninhos 26/356 (7,3%)*

\* proporções calculadas sem exclusão de casos com evidências de troca sequencial de macho guarda, fêmea ou casal.

### 3.4. Discussão

Apesar da alta complexidade do sistema de acasalamento de *T. albitarse* observada nos estudos comportamentais, a proporção de filhas certamente provenientes de cópulas extrapar encontrada nas análises genéticas do presente estudo foi 9,1%, o que indica que apesar da receptividade das fêmeas a cópulas extrapar (poligamia social), o sistema de acasalamento genético da espécie é predominantemente monogâmico (monogamia genética). Como consequência, este resultado evidencia também que a presença do macho guarda durante a nidificação aumenta suas chances de ganho em sucesso reprodutivo e reduz efetivamente o impacto de competidores intra-específicos, justificando assim a manutenção desse traço comportamental ao longo do tempo evolutivo em *T. albitarse* e, possivelmente, em outras espécies do subgênero.

O macho guarda de *T. albitarse*, assim como em outras espécies de *Trypargilum*, copula repetidamente com a parceira com a qual interage, especialmente antes da oviposição (COVILLE, 1982; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; BROCKMANN, 1992; ALMEIDA, 2010; BUSCHINI & DONATTI, 2012). De acordo com AMARANTE (1991a), apesar da presença constante do macho guarda de *T. albitarse* em ninhos ativos, fêmeas foram receptivas a cópulas extrapar e se acasalaram com o macho patrulheiro e, na maioria das vezes, o macho guarda não esboçou reação alguma diante do comportamento promíscuo da parceira. Estudos envolvendo outras espécies de *Trypargilum* também apontaram que o patrulheiro tentou copular constantemente com fêmeas já assistidas por um macho guarda, revelando que esse comportamento também parece ser comum a outras espécies do táxon (COVILLE & COVILLE, 1980; HOOK, 1984; BROCKMANN & GRAFEN, 1989; AMARANTE, 1991a; GARCIA & ADIS, 1995; BROCKMANN, 1992; BUSCHINI & DONATTI, 2012).

De acordo com Coville (1982), a guarda do ninho pelo macho em *Trypargilum* é uma forma de garantir sua descendência, evitando que machos rivais tenham acesso à

fêmea que interage antes da oviposição. Registros comportamentais apontaram que, mesmo que fêmeas de algumas espécies de *Trypargilum* sejam receptivas a cópulas extrapar, ao retornar ao seu ninho podem copular novamente com o parceiro residente (GARCIA & ADIS, 1995; BUSCHINI & DONATTI, 2012). Quando a fêmea copula com mais de um macho, cria condições para a competição entre o esperma dos parceiros sexuais e, estudos apontam que em insetos, o último parceiro a copular antes da oviposição leva vantagem no momento da fertilização (PARKER, 1984; ALCOCK, 1991, 1994). Esse mecanismo é denominado precedência espermática e está presente na maioria dos Hymenoptera estudados (MICHENER, 1974), possibilitando o surgimento de várias estratégias reprodutivas, como por exemplo: (1) machos seguindo fêmeas após a cópula até o momento da oviposição, (2) machos permanecendo próximos a agregações de nidificação e (3) machos se posicionarem dentro de ninhos ativos esperando pela fêmea (ALCOCK, 1978; THORNHILL & ALCOCK, 1983). Em todos esses casos, o macho gasta tempo e energia no intuito de ser o último a copular antes da oviposição, indicando que esse mecanismo pode ser efetivo na obtenção da paternidade da prole. BANKS (1995) encontrou correlação positiva entre o tempo gasto guardando o ninho e o número de cópulas obtidas por machos de *Cerceris binodis* (Hymenoptera: Crabronidae) e, provavelmente, isso também se aplique a espécies de *Trypargilum*.

Almeida (2010), durante o trabalho a campo, registrou constantemente fêmeas de *T. albitarse* copulando com o macho guarda ao longo da nidificação, porém as cópulas registradas antes da oviposição foram mais longas do que as observadas em outras etapas da nidificação. O mesmo mecanismo foi descrito para *T. politum* por Brockmann & Grafen (1989). Segundo Walker (1980), a pressão de seleção exercida pela poligamia social da fêmea pode direcionar a adaptações como a limpeza da espermateca pelos machos durante a cópula. Waage (1979) registrou que o edeago de *Calopteryx maculata* (Odonata: Calopterygidae) removeu entre 88 e 100% do esperma de cópulas anteriores. Nesse sentido, é possível que as cópulas curtas registradas durante o provisionamento, ou após cópulas extrapar, em *Trypargilum* sejam responsáveis pela remoção do esperma de machos competidores, enquanto as cópulas longas, registradas antes da oviposição, responsáveis pela fertilização. A

aquisição de uma adaptação como esta pode fornecer altas taxas de paternidade ao macho guarda, como revelado pelas análises genéticas em *T. albitarse*, mesmo que as fêmeas sejam receptivas a cópulas com machos patrulheiros.

A receptividade de fêmeas de *Trypargilum* a cópulas repetidas ao longo da vida representa custos, como o elevado gasto energético e a possibilidade de aquisição de doenças ou predação (DALY, 1978; THORNHILL & ALCOCK, 1983; LEWIS JR, 1987). No entanto, apesar destes custos potenciais, esta receptividade pode ser explicada pelos achados de Moreira (2007), que ao analisar comparativamente a morfologia da espermateca de espécies dos dois subgêneros de *Trypoxylon* averiguou que em *Trypargilum* esse órgão é vestigial quando comparado ao de *Trypoxylon s. str.*, fator que demandaria a necessidade de cópulas antes da oviposição para gerar filhas. Nesse sentido, estudos envolvendo a morfologia do aparelho reprodutor de *Trypargilum* merecem destaque para que hipóteses sobre precedência espermática, limpeza da espermateca e espermateca vestigial possam ser testadas.

Amarante (1991a) registrou combates entre machos de *T. albitarse*, os quais normalmente resultaram na expulsão do patrulheiro. No entanto, em uma observação AMARANTE (1991a) registrou um residente sendo desalojado pelo rival depois de um combate iniciado dentro e finalizado fora do ninho. Estudos envolvendo outras espécies de *Trypargilum* também relataram troca de par durante o processo de nidificação. Coville & Coville (1980) para *T. tenocitlan* e Coville *et al.* (2000) para *T. lactitarse* na Costa Rica, Brockmann & Grafen (1989) para *T. politum* nos Estados Unidos, Garcia & Adis (1995) para *T. rogenhoferi* e Buschini & Donatti (2012) para *T. agamemnon* no Brasil registraram combates entre machos, os quais em alguns casos foram seguidos de desalojamento do macho residente e troca de guarda. Diante disso, tentativas de invasão e a troca de parceiro após uma luta parecem ser práticas comuns em ninhos de *Trypargilum*. Os resultados genéticos encontrados para *T. albitarse* corroboram essas observações, pois foi possível detectar troca sequencial de pai em ninhos desta espécie, o que não ocorreu necessariamente no início de um tubo de barro novo.

Além da troca sequencial de pai, também foi possível constatar pelos resultados genéticos alguns casos em que um tubo foi iniciado por uma mãe e finalizado por outra,

que deu sequência à nidificação e, conseqüentemente, foi a responsável pela prole da(s) célula(s) e do(s) tubo(s) seguinte(s). De acordo com Brockmann (1980), fêmeas de *Trypargilum* que nidificam em tubos de barro podem dar continuidade a um ninho ocupado anteriormente por outra fêmea, duas fêmeas podem aprovisionar o mesmo ninho sem ao menos se encontrarem e o guarda ser receptivo a ambas, ou uma fêmea intrusa pode abrir a parede do tubo, e substituir o ovo original por um ovipositado por ela mesma (cleptoparasitismo intra-específico). Almeida (2010) encontrou evidências de que essas três situações ocorrem em *T. albitarse*, corroborando os achados genéticos para os ninhos com mais de uma mãe em *T. albitarse*. Dessa forma, a troca sequencial de um ou ambos os parentais apontou que os 29 ninhos amostrados representavam meramente ninhos físicos, os quais na verdade, representavam 35 grupos familiares.

Cinco machos diploides foram encontrados, em um total de 172 genotipados, provenientes de dois ninhos físicos. Vale ressaltar, que dois desses machos já haviam sido caracterizados como heterozigotos para marcadores alozímicos (ALMEIDA JC, dados não publicados), reforçando assim sua condição de diploidia. Embora nos dois ninhos em questão a segregação mendeliana esteja fora do esperado para um casal que compartilha o mesmo alelo do loco CSD (1 fêmea : 1 macho diplóide), isso não deve ser levado em conta, uma vez que tais machos foram encontrados em ninhos com mais de uma mãe.

Embora algumas cópulas extrapar tenham sido detectadas nas análises deste estudo, os achados sobre a estrutura genética encontrada em ninhos de *T. albitarse* sugerem que existe um pai predominante em cada ninho genético amostrado. Dessa forma, estes resultados reforçam a garantia de paternidade do macho guarda por cópulas múltiplas em *T. albitarse* e novos trabalhos sob essa perspectiva devem ser conduzidos no intuito de testar se os resultados encontrados neste estudo se aplicam a outras espécies desse grupo de vespas.

## **CAPÍTULO 4: Variação gênica e diferenciação genética entre populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae)**

---

### **Resumo**

*Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae) constitui um gênero de vespas solitárias que aprovisionam suas células de cria com aranhas paralisadas de forma massal. Uma vez que pouco se conhece sobre a genética populacional desse grupo de vespas, este estudo investigou a variabilidade e a estrutura genética de cinco populações de *Trypoxylon albitarse*, uma espécie que apresenta ampla distribuição na região Neotropical, com registros desde o Panamá até o norte da Argentina. Os demes foram amostrados nas seguintes localidades: Ilhéus (BA), Viçosa (MG), Lavras (MG), São Carlos (SP) e Guarapuava (PR). Oito locos microssatélites espécie específicos polimórficos foram utilizados nas análises. A diversidade genética foi alta nas cinco populações amostradas. Comparações par a par utilizando os índices  $F_{st}$  e  $D_{est}$  revelaram diferenciação interpopulacional significativa, exceto para um par de populações. Valores estimados de  $F_{st}$  e  $D_{est}$ , a Análise de Variância Molecular (AMOVA) e o teste de atribuição igualmente revelaram uma diferenciação consideravelmente alta entre os demes. O padrão de diferenciação obtido através das análises Bayesiana e de componentes principais (PCA) identificaram dois agrupamentos genéticos alternativos. As vespas de Viçosa e São Carlos formaram um agrupamento, as de Lavras e Guarapuava outro, enquanto as fêmeas de Ilhéus foram distribuídas entre ambos. Adicionalmente, um teste de Mantel não apontou correlação entre distância genética e geográfica. Com base nos resultados, foi possível concluir que *T. albitarse* apresentou elevada variação genética e estruturação populacional significativa. Este estudo representa o primeiro trabalho proposto utilizando marcadores genéticos adequados no intuito de determinar a estrutura genética de populações de *Trypoxylon*, abrindo um novo e amplo campo de análises comparativas com outras espécies do grupo que venham a ser estudadas sob essa perspectiva.

**Palavras-chave:** genética de populações, *Trypoxylon*, microssatélites.

#### 4.1. Introdução

*Trypoxylon* é um gênero diverso de vespas solitárias da família Crabronidae, que provisionam seus ninhos com aranhas paralisadas de forma massal em células de cria, construídas linearmente em cavidades preexistentes ou em tubos de barro confeccionados pelas próprias fêmeas (COVILLE & COVILLE, 1980; COVILLE 1982). Ao término do provisionamento de cada célula, um ovo é colocado sobre uma das presas estocadas e uma divisória de barro é construída em seguida com o propósito de individualizar as células de cria (BOHART & MENKE, 1976; COVILLE, 1982).

O gênero está subdividido nos subgêneros *Trypoxylon* e *Trypargilum* (RICHARDS, 1934). *Trypoxylon s. str.* é o mais diverso e tem distribuição mundial, enquanto *Trypargilum* agrupa com 88 espécies e está restrito ao Novo Mundo (PULAWSKI, 2013), com registros desde o sul do Canadá ao sul da Argentina, porém a maioria das espécies é endêmica da região Neotropical e a maior diversidade está concentrada na América do Sul (AMARANTE, 2002).

*T. albitarse* tem ampla distribuição na região Neotropical, com registros do Panamá ao norte da Argentina, sendo facilmente encontrada em paredes de construções humanas, como prédios e pontes, localizados próximos a áreas florestadas (AMARANTE, 1991a; AMARANTE, 2002). A grande distribuição da espécie, associada ao fato de nidificar com sucesso em áreas sob forte ação antrópica, sugere que não existem barreiras geográficas significativas que impeçam sua dispersão. Isso faz com que essas vespas sejam consideradas um grupo interessante para estudos com enfoque direcionado para a genética populacional, pois coloca em pauta questionamentos envolvendo o nível da variação genética e como esta variabilidade está distribuída ou particionada no interior de suas populações.

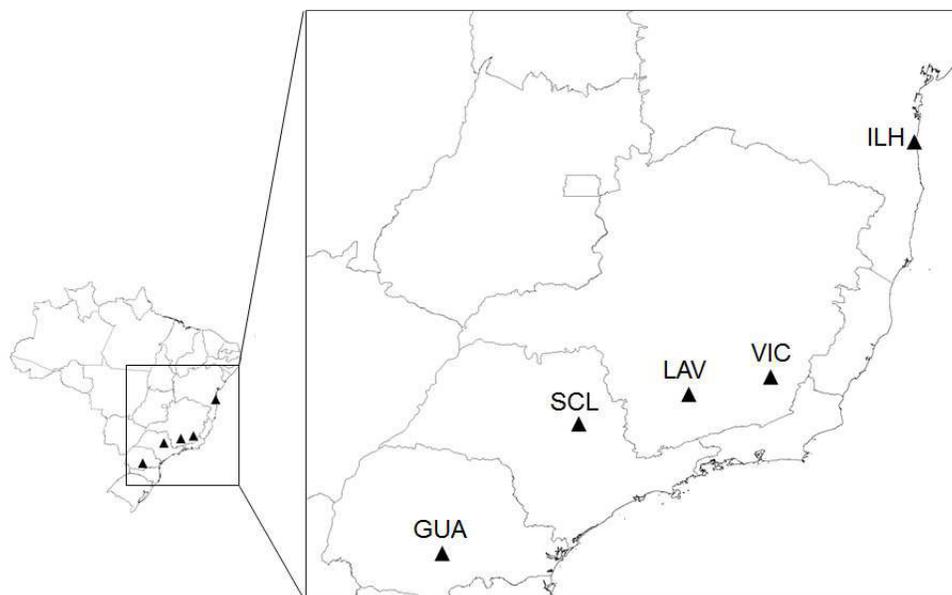
Considerando que não há relatos na literatura a respeito da genética de populações de *T. albitarse* utilizando marcadores com alto grau de polimorfismo, ou mesmo de outras espécies de *Trypoxylon*, o objetivo deste trabalho foi determinar a variabilidade e diferenciação genéticas de populações, utilizando oito locos

microssatélites polimórficos e cinco populações de *T. albitarse* amostradas em quatro estados do Brasil.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1. Trabalho a campo e amostragem

Espécimes de 99 ninhos de *T. albitarse* foram amostrados em cinco localidades geográficas de quatro estados brasileiros (Figura 1 e Tabela 1). A distância geográfica entre os locais de amostragem está disponível na Tabela 2. Quando localizados, tubos de barro da espécie foram cuidadosamente abertos com o auxílio de pinças de ponta fina e, caso imaturos no estágio de pupa fossem encontrados, casulos foram coletados e colocados em tubos plásticos individuais. Em seguida, o material foi levado ao laboratório, onde foi mantido à temperatura ambiente até atingir o estágio adulto, quando foi possível determinar o sexo, seguindo-se a estocagem do material ainda fresco a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do DNA.



**Figura 1.** Mapa das populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* amostradas para este estudo. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Códigos dos locais de amostragem, localização (incluindo o município e a região brasileira), coordenadas geográficas e número de ninhos amostrados em cada uma das cinco localidades onde espécimes de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* foram coletados.

<b>Código da localidade</b>	<b>Localização</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>Número Amostral</b>
<b>ILH</b>	Campus da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA	14°47'46"S, 39°10'22"W	17
<b>VIC</b>	Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG	20°45'39"S, 42°51'50"W	17
<b>LAV</b>	Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG	21°13'56"S, 44°59'37"W	14
<b>SCL</b>	Campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP	21°59'3"S, 47°52'55"W	37
<b>GUA</b>	Parque Municipal das Araucárias, Guarapuava, PR	25°23'36"S, 51°27'19"W	14

**Tabela 2.** Distância geográfica entre os cinco locais de amostragem de ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1.

	<b>ILH</b>	<b>VIC</b>	<b>LAV</b>	<b>SCL</b>	<b>GUA</b>
<b>ILH</b>	-				
<b>VIC</b>	778 km	-			
<b>LAV</b>	955 km	226 km	-		
<b>SCL</b>	1232 km	537 km	311 km	-	
<b>GUA</b>	1752 km	1018 km	805 km	523 km	-

#### 4.2.2. Extração do DNA, amplificação dos locos microssatélites e genotipagem

O DNA total foi extraído após maceração de três pares de pernas ou do mesossoma de espécimes adultos de *T. albitarse* utilizando o protocolo de fenol-clorofórmio (FERNANDES-SALOMÃO, *et al.* 2005) ou Chelex (WALSH, *et al.* 1991).

As amostras foram genotipadas após reações de PCR utilizando os nove locos microssatélites prospectados e caracterizados por Almeida *et al.* (2013) para esta espécie: Talb01, Talb02, Talb03, Talb05, Talb06, Talb07, Talb09, Talb12 e Talb14. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando 250 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM do *primer forward* marcado com fluorescência, 0,5 µM do *primer reverse*, 1 × BioTools buffer e 1U de Taq DNA polymerase (BioTools, Madri, Espanha) em um volume final de 10 µL. As condições de amplificação consistiram em um passo inicial de desnaturação a 94°C por três minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação na temperatura específica para cada loco indicada por Almeida *et al.* (2013) durante 20 segundos, e extensão da cadeia a 72°C por um minuto. Os ciclos de amplificação foram seguidos por um passo final de extensão a 70°C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação foram analisados após corridas realizadas em sequenciador automático MegaBace-1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O tamanho dos fragmentos foi estabelecido por picos de genotipagem, através de comparações com o marcador de tamanho ET550R no programa MegaBace Fragment Profiler versão 1.2 (GE Healthcare).

Aproximadamente, 13% das amostras foram retipadas no intuito de checar a confiabilidade dos dados obtidos, além de confirmar genótipos obtidos a partir de picos fracos ou duplos. No intuito de evitar *missing data*, nos casos de ausência de amplificação para um determinado loco, a PCR foi repetida por até três vezes.

Os métodos de correção usualmente empregados em estudos envolvendo marcadores microssatélites no intuito de detectar alelos nulos ou corrigir possíveis erros de genotipagem não foram utilizados no presente estudo, com base na alta taxa

de acerto nas retipagens, aliada à amplificação positiva obtida em todos os locais utilizados para um total de 174 machos (dados não publicados).

### 4.2.3. Análise dos dados

Com o propósito de evitar resultados enviesados, apenas espécimes de ninhos distintos foram utilizados nas análises, impedindo que o parentesco entre as vespas de um mesmo ninho interferisse nos valores estimados de diversidade e diferenciação genéticas.

Tal como ocorre em outros Hymenoptera, a haplodiploidia determina o sexo de *T. albitarse*, com machos se desenvolvendo a partir de ovos não fertilizados e são haploides, enquanto as fêmeas se desenvolvem de óvulos fertilizados e são diploides. Com base nessa particularidade, somente fêmeas foram utilizadas nas análises.

Dados genotípicos foram inicialmente analisados no programa Genepop 4.0.10 (RAYMOND & ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008), utilizando métodos de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) com 10.000 dememorizações, 20 processamentos e 5.000 interações por processamento, possibilitando a obtenção de estimativas de heterozigotidade observada e esperada para todos os locos. Adicionalmente, utilizando também o *software* Genepop, testes exatos foram conduzidos no intuito de detectar desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação entre os locos. O nível de significância de 5% foi adotado em todos os testes estatísticos e a correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989) foi utilizada nos casos em que foram detectados desvios significativos.

Dado o diferente tamanho amostral entre as populações de *T. albitarse* do presente estudo, o programa HP-Rare 1.1 (KALINOWSKI, 2005), que utiliza o método de rarefação (KALINOWSKI, 2004), foi utilizado para calcular a riqueza alélica total e de alelos privados em cada localidade.

A diferenciação populacional foi obtida pela estimativa dos valores de  $F_{st}$  (WEIR & COCKERHAM, 1984) e de  $D_{est}$  (JOST, 2008) total e par a par, utilizando os programas FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001) e GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2006), respectivamente. Adicionalmente, a partição genética da variação dentro e entre populações foi estimada através de Análise Molecular de Variância (AMOVA, EXCOFFIER *et al.*, 1992) utilizando o programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). O nível de diferenciação entre populações foi investigado também em um teste

de atribuição, conduzido no programa GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2006), o qual indica a porcentagem de indivíduos corretamente atribuídos à sua população de origem.

A estrutura populacional foi investigada utilizando uma abordagem de agrupamento por inferência Bayesiana no programa Structure v.2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000), em que não foi fornecida informação prévia das localidades de origem dos indivíduos. Mediante o modelo de ancestralidade de mistura com frequência alélica independente entre as populações, 10 simulações foram conduzidas para cada  $K$  inferido (número de agrupamentos genéticos), que variou de um a 10. Em cada corrida, foram conduzidas 1.000.000 repetições de *burn-in*, seguidas de 5.000.000 repetições de MCMC. As probabilidades estimadas em cada corrida foram utilizadas para estimar o valor de  $\Delta K$  (EVANNO *et al.*, 2005), que representa o número mais provável de agrupamentos genéticos ( $K$ ) da base de dados. Uma análise de componentes principais (PCA) também foi realizada para identificar a distribuição da variação genética nas localidades geográficas amostradas utilizando o programa GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2006).

Visando analisar a correlação entre a distância genética e geográfica, um teste de Mantel (MANTEL, 1967) foi conduzido no programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001). A distância genética foi obtida a partir da linearização do  $F_{st}$ ,  $F_{st}/(1 - F_{st})$ , e a distância geográfica entre as localidades pelas coordenadas geográficas do ponto central de cada população. Os valores de  $P$  foram calculados baseados em 2.000 aleatorizações.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Estimativas de diversidade e variabilidade genética

Fêmeas de 99 ninhos de *T. albitarse* (uma fêmea por ninho), provenientes de cinco localidades brasileiras, foram genotipadas para nove locos microssatélites. O loco Talb12 mostrou-se monomórfico em todas as populações e não foi incluído na análise dos dados; desta forma, somente oito locos foram utilizados nas análises. A ausência de amplificação em alguns locos, mesmo após repetições da PCR, gerou uma taxa de aproximadamente 3% de *missing data*.

Análises para a verificação de equilíbrio de Hardy-Weinberg e estimativas de heterozigidade observada e esperada para cada loco e população são apresentadas na Tabela 3. Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram detectados ( $P < 0,05$ ), mas após aplicação da correção sequencial de Bonferroni, a maior parte dos desvios não se mostraram significativos. Foi possível averiguar diferenças substanciais nos níveis de variabilidade entre os locos. O loco Talb09 mostrou-se polimórfico em apenas duas populações, enquanto Talb14 apresentou monomorfismo somente em uma delas.

A heterozigidade média esperada ( $H_e$ ) não diferiu substancialmente entre as populações, variando de 0,557 a 0,634 (Tabela 3). Os valores de  $H_e$  para cada loco não diferiram substancialmente entre populações para cada loco, exceto para Talb01 que variou de 0,177 a 0,727. O loco Talb09 foi o que apresentou menor variação, com valores estimados de  $H_e$  entre 0,147 e 0,218, enquanto Talb07 foi o mais variável, exibindo baixa variação de  $H_e$  entre as populações (0,86 a 0,931). O valor de riqueza alélica ( $A$ ) por loco variou entre as cinco populações e alelos privados foram detectados em todos os demes (Tabela 4).

**Tabela 3.** Tamanho amostral (n), heterozigozidade observada (Ho) e esperada (He) e valores de *P* para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em cinco populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1.

População		Talb01	Talb02	Talb03	Talb05	Talb06	Talb07	Talb09	Talb14	Média
ILH (n=17)	H <sub>o</sub>	0,411	0,312	0,588	0,294	0,25	0,647	-	0,176	0,382
	H <sub>e</sub>	0,57	0,717	0,704	0,748	0,671	0,86	-	0,169	0,634
	EHW	0,032	<b>0,0009*</b>	0,63	<b>0,0005*</b>	<b>0,0007*</b>	<b>0,0005*</b>	-	1	
VIC (n=17)	H <sub>o</sub>	0,117	0,411	0,882	0,533	0,428	0,75	-	0,117	0,462
	H <sub>e</sub>	0,392	0,347	0,693	0,866	0,626	0,9	-	0,221	0,577
	EHW	0,002	1	0,638	<b>0,001*</b>	0,232	0,071	-	0,061	
LAV (n=14)	H <sub>o</sub>	0,142	0,285	0,615	0,571	0,583	0,785	0	-	0,425
	H <sub>e</sub>	0,727	0,37	0,643	0,722	0,721	0,931	0,147	-	0,608
	EHW	<b>0,0001*</b>	0,059	0,478	0,533	0,194	0,054	0,04	-	
SCL (n=37)	H <sub>o</sub>	0,135	0,513	0,567	0,864	0,648	0,891	-	0,323	0,563
	H <sub>e</sub>	0,177	0,554	0,664	0,840	0,709	0,865	-	0,285	0,584
	EHW	0,031	<b>0,008*</b>	0,414	0,119	0,082	0,332	-	1	
GUA (n=14)	H <sub>o</sub>	0,214	0,230	0,714	0,642	0,666	0,583	0,076	0,071	0,399
	H <sub>e</sub>	0,428	0,483	0,656	0,878	0,731	0,927	0,218	0,14	0,557
	EHW	0,075	0,025	0,218	0,055	0,278	<b>0*</b>	0,038	0,037	

- Loco monomófico, \* Significativo para  $P < 0,05$  mesmo após a correção sequencial de Bonferroni.

**Tabela 4:** Valores de riqueza alélica (A) e de alelos privados (Ap) para as cinco populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, estimados a partir do método de rarefação. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1.

Loco	ILH		VIC		LAV		SCL		GUA	
	A	Ap	A	Ap	A	Ap	A	Ap	A	Ap
Talb01	4	1	3	1	5	2	2,8	0,89	4	1
Talb02	5	0	3	0,1	4	0	6,04	2,24	4	1
Talb03	4	0	4	0	4	0	4,67	0	5	0,32
Talb05	5	0	10	1,1	5	0	10,11	0,89	8	1
Talb06	3	0	4	1,32	4	0	5,64	0,99	5	0
Talb07	11	0	11	1,32	14	2	9,53	0	12	2
Talb09	1	0	1	0	2	0	1	0	3	1
Talb14	3	0	3	1	1	0	2,9	0	3	1

### 4.3.2. Estrutura genética

Os valores par a par de  $F_{st}$  e  $D_{est}$  foram calculados para todos os locos combinados e apontaram que os valores de diferenciação genética variaram entre as populações (Tabela 5). Todos os pares de populações resultaram em valores significativos de diferenciação genética ( $P < 0,05$ ), exceto entre LAV - GUA ( $F_{st} = 0,03$  e  $D_{est} = 0,011$ ). O par de populações que apresentou maior nível de diferenciação foi VIC - LAV, com valores de 0,132 e 0,275 para  $F_{st}$  e  $D_{est}$  respectivamente.

**Tabela 5.** Comparação par a par dos valores de  $F_{st}$  (abaixo da diagonal) e  $D_{est}$  (acima da diagonal) para pares de populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Os códigos dos locais de amostragem (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA) estão descritos na Tabela 1.

	ILH	VIC	LAV	SCL	GUA
ILH	-	0,103	0,095	0,085	0,101
VIC	0,063	-	0,275	0,084	0,214
LAV	0,061	0,132	-	0,231	<b>0,011*</b>
SCL	0,05	0,051	0,11	-	0,165
GUA	0,061	0,106	<b>0,03*</b>	0,082	-

\* Diferenciação genética não significativa ( $P < 0,05$ ).

Os valores globais de  $F_{st}$  e  $D_{est}$  indicaram diferenciação populacional significativa, com valores numéricos de 0,11 e 0,13 ( $P < 0,05$ ), respectivamente. A distribuição da variação genética também foi calculada dentro e entre populações através de Análise Molecular de Variância, a qual apontou que, embora a maior fração da variação esteja concentrada dentro das populações (88,72%), o componente da variação entre populações (11,28%) foi significativo ( $P = 0$ ) (Tabela 6). A diferenciação populacional também foi evidenciada no teste de atribuição, em que 79% dos indivíduos foram devidamente atribuídos à sua população de origem.

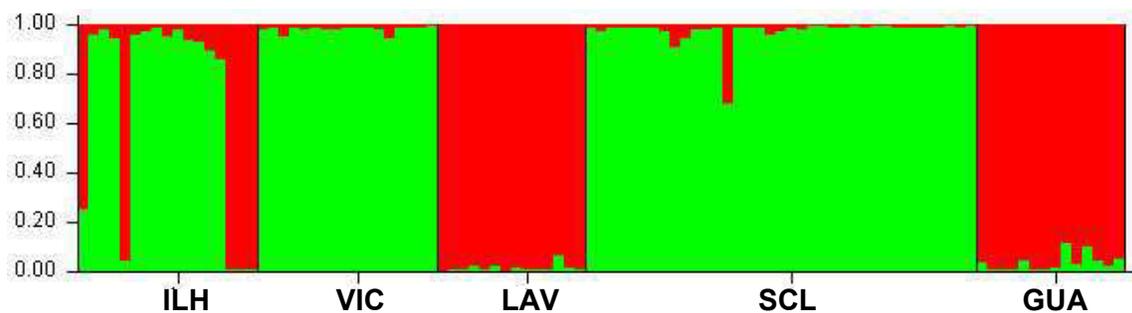
**Tabela 6.** Resultados da análise molecular de variância (AMOVA), com os valores da distribuição da variação dentro e entre as cinco populações amostradas de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*.

Fonte da variação	SQ	Variância	% da variação	P
Entre populações	47,6	0,26	<b>11,28</b>	0
Dentro de populações	394,58	2,1	<b>88,72</b>	0

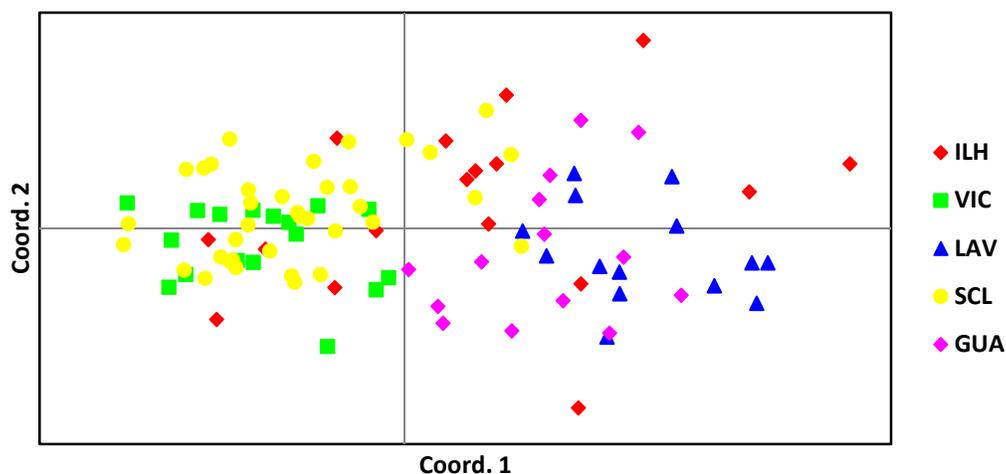
O padrão de diferenciação obtido pela análise Bayesiana identificou dois agrupamentos genéticos alternativos ( $K=2$ ). De acordo com o gráfico fornecido pelo programa Structure (Figura 2), existe estruturação populacional significativa. As vespas de VIC e SCL foram assinaladas predominantemente a um agrupamento (verde), enquanto que as de LAV e GUA representaram outro agrupamento (vermelho). ILH se mostrou um grupo intermediário, com a maior parte dos espécimes atribuídos ao mesmo agrupamento de VIC e SCL (verde), enquanto os demais foram assinalados ao agrupamento LAV - GUA (vermelho).

Um padrão muito similar ao obtido pela análise Bayesiana foi verificado na análise de componentes principais (PCA), na qual espécimes de VIC e SCL formaram um agrupamento genético, enquanto os de LAV e GUA formaram outro e, as vespas de ILH se distribuíram entre os dois grupos (Figura 3). Cabe ressaltar, que nesta análise o eixo 1 explicou apenas 30,13% e o eixo 2 18,38% da variação genética encontrada.

Por fim, um teste de Mantel demonstrou que para os dados do presente estudo não houve correlação positiva entre a distância genética e geográfica ( $R = -0,76$ ;  $P=0$ ).



**Figura 2.** Estrutura populacional estimada por inferência Bayesiana para cinco populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, obtida no gráfico de uma corrida para K=2. Cada indivíduo representa uma linha vertical, em que a cor indica sua chance de atribuição a cada um dos agrupamentos alternativos (escala à esquerda).



**Figura 3.** Análise de componentes principais (PCA) de cinco populações de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (ILH, VIC, LAV, SCL e GUA), baseada na distância genética obtida através de marcadores microssatélites.

#### 4.4 Discussão

Os valores de heterozigotidade esperada foram similares entre as populações de *T. albitarse* analisadas (Tabelas 3 e 4); no entanto, ao comparar as estimativas de riqueza alélica e de alelos privados para cada loco foi possível encontrar valores distintos entre os demes em questão (Tabela 4), o que indica que existem diferenças na diversidade genética destas populações e que, possivelmente, o fluxo gênico entre elas está limitado ou restrito.

De acordo com Kalinowski (2005), o número de alelos ou riqueza alélica é uma medida simples de diversidade genética, onde uma grande amostra pode conter maior riqueza alélica comparada a uma amostra menor; ou seja, a riqueza alélica é altamente dependente do tamanho amostral. Nesse sentido, o método de rarefação foi utilizado no presente estudo para estimar a riqueza alélica e de alelos privados (KALINOWSKI, 2004), no intuito de reduzir os efeitos decorrentes do tamanho amostral diferente de cada localidade. GUA, uma das populações com menor amostragem ( $n = 14$  ninhos), no geral exibiu o maior valor para esses índices (Tabela 4).

As estimativas de equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações de *T. albitarse* apontaram que todos os locos, exceto o Talb03, demonstraram, pelo menos, um valor de  $P$  menor do que o nível de significância de 5%; porém, após a correção sequencial de Bonferroni, a maior parte dos desvios mostrou-se não significativa (Tabela 3). Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg são usualmente associados à endogamia, estratificação populacional, ação da seleção natural, acasalamentos preferenciais e/ou a presença de alelos nulos na base de dados (TEMPLETON 2011). Entre estas possibilidades, a ação da seleção natural parece pouco provável, tendo em vista que marcadores microssatélites são considerados neutros e, portanto, não estariam sob o efeito deste fator evolutivo. A amplificação positiva de 174 machos (dados não publicados), aliada à alta taxa de retipagem do presente estudo indicam que alelos nulos não devem ser comuns nestes locos. Níveis altos de acasalamentos preferenciais certamente gerariam desvios no EHW direcionados para todos os locos e

não somente para casos isolados, como observado. A estratificação populacional e a endogamia parecem ser as alternativas mais prováveis para *T. albitarse*, pois mesmo que desvios no EHW não sejam observados para todos os locos, os ninhos desta espécie foram amostrados em áreas pequenas, onde aparentemente ninhos novos são fundados ao lado de ninhos preexistentes (grupos familiares), havendo assim uma boa chance de que haja algum relacionamento genético entre espécimes amostrados em ninhos distintos.

Levando em conta a grande distância geográfica entre os demes amostrados de *T. albitarse* (Tabela 2), era esperado encontrar diferenciação significativa entre os pares de populações analisados. Os valores par a par dos índices  $F_{st}$  e  $D_{est}$  foram significativos para todos os pares de populações, exceto para GUA - LAV (Tabela 5). Duas hipóteses podem explicar este resultado: (1) foram as duas populações com a menor amostragem ( $n=14$ ), e (2) ambas as populações foram as únicas que apresentaram polimorfismo para o loco Talb09, GUA exibindo três e LAV dois alelos neste loco. Uma análise alternativa, excluindo o loco Talb09, foi realizada para estimar valores de  $F_{st}$  e  $D_{est}$  par a par, no intuito de testar a segunda hipótese proposta acima. A diferenciação genética para o par GUA - LAV permaneceu não significativa, rejeitando a hipótese em questão. Consequentemente, é provável que os resultados encontrados nos índices de diferenciação genética para o par GUA - LAV sejam reflexo da baixa amostragem obtida nestas localidades.

De acordo com Jost (2008), a estatística  $F$  descrita inicialmente por Wright (1950) foi desenvolvida para sistemas de baixa diversidade ou locos com baixo polimorfismo e, por esta razão, subestima o real nível de diferenciação genética entre subpopulações. Embora as estimativas de diferenciação detectadas pelo valor de  $D_{est}$  tenham sido usualmente maiores que de  $F_{st}$  para populações de *T. albitarse*, foi possível observar uma associação positiva entre os dois parâmetros (Tabela 5), indicando que essas medidas forneceram estimativas similares de diferenciação populacional. Segundo Bird *et al.* (2011), é aconselhável utilizar os parâmetros  $F_{st}$  e  $D_{est}$  em combinação, uma vez que representam propriedades diferentes da partição populacional e, caso o resultado destas estatísticas sejam concordantes, é possível chegar a uma conclusão mais confiável.

Os resultados apontaram para um teste de Mantel não significativo, pois não houve correlação positiva entre as distâncias genética e geográfica. Isso faz sentido ao observarmos os dois agrupamentos obtidos nas análises de estruturação populacional e as localidades dispostas em cada agrupamento. GUA, o ponto de amostragem mais ao sul, foi agrupado com LAV, o qual é muito mais distante de GUA que SCL (Tabela 2). Seguindo a lógica do isolamento por distância, SCL deveria ser considerado um grupo intermediário entre GUA e LAV, porém isso não foi observado. O mesmo ocorreu no outro agrupamento, em que VIC foi agrupada com SCL, no entanto, VIC é mais perto geograficamente de LAV do que de SCL; portanto, era esperado que VIC fosse agrupada com LAV, e não com SCL. Outro fator importante está no fato de que VIC e LAV, que representam as duas populações mais próximas geograficamente na amostragem (Tabela 2), exibiram os valores mais significativos de diferenciação nas comparações par a par de  $F_{st}$  e  $D_{est}$ . Adicionalmente, foram realizadas tentativas no intuito de conduzir uma AMOVA com um terceiro nível hierárquico, formando grupos de populações diferentes de acordo com o seu posicionamento fornecido pelas análises de estruturação; no entanto, não foi encontrada variância molecular significativa entre grupos nos testes realizados. Como mencionado anteriormente, é possível que o baixo  $n$  amostral dos demes, particularmente, LAV e GUA, tenha enviesado os resultados obtidos. Além disso, a deriva genética também pode ter contribuído para esses resultados, uma vez que é considerada um fator evolutivo forte em populações pequenas; ademais, caso populações locais de *T. albitarse* sejam fundadas por poucos indivíduos, poderia haver um efeito fundador a cada ciclo de colonização. Nesse sentido, estudos envolvendo regiões do DNA mitocondrial podem fornecer informações valiosas a respeito da colonização dessas áreas pelas fêmeas.

A população ILH mostrou-se intermediária entre os dois agrupamentos encontrados nas análises de estruturação populacional. Uma possível explicação para este achado seria que o centro de origem desta espécie esteja mais próximo a esta localidade do que das demais, pois tendo em vista que *T. albitarse* está distribuída do Panamá ao norte da Argentina (AMARANTE, 2002), seria possível que, com o tempo, tenha se dispersado para o sul e colonizado novas áreas, dando origem aos dois agrupamentos encontrados. No entanto, os baixos valores de riqueza alélica e de

alelos privados (Tabela 4) sugerem que esta hipótese seja pouco provável. Seguindo essa lógica, os altos valores obtidos para esses índices na população GUA, de mais ao sul do delineamento amostral, indicaram justamente o contrário, ou seja, que a espécie pode ter seguido uma rota de colonização do sul para o norte. Um estudo subsequente utilizando mais populações, maior amostragem de ninhos nestes sítios e análises com um número maior de locos microssatélites se faz necessário para a obtenção de justificativas mais conclusivas para este resultado.

Existe pouca informação disponível sobre a capacidade de voo e dispersão em espécies de *Trypoxylon*. Buschini & Donatti (2012) e Buschini & Bergamaschi (*in press*) utilizaram a técnica de marcação e recaptura em espécimes de *T. agamemnon*, obtidos utilizando ninhos-armadilha em um pequeno fragmento florestal, no intuito de estimar sua longevidade, mas obtiveram baixas taxas de recaptura (aproximadamente 34% dos machos e 23% das fêmeas). De acordo com Buschini (informação pessoal), as vespas que emergiram dos ninhos-armadilha levados ao laboratório foram marcadas e soltas no mesmo sítio onde seu ninho foi coletado não foram observadas nidificando no local de estudo, ao contrário das que foram capturadas durante o processo de nidificação, marcadas, liberadas e acompanhadas por mais de um ano na mesma área. Molumby (1996) também marcou e liberou espécimes de *T. politum* que emergiram no laboratório e relatou baixas taxas de recaptura de vespas marcadas (aproximadamente 16,5% dos machos e 20% das fêmeas). Um macho marcado foi capturado por Molumby em uma ponte a mais de 7 km apenas seis horas após ser visto no local de estudo; e outro foi observado guardando um ninho a mais de 30 km da área de estudo dez dias após sua marcação. Ao estudar populações de *T. palliditarse* de Trinidad e Tobago, Freeman (1981) relatou que a espécie apresenta alta taxa de emigração dos seus locais de nascimento. Amarante (1991a) observou espécimes marcados de *T. albitarse* por apenas 42 dias, obteve uma baixa taxa de recaptura de adultos marcados (4,6% e 15,1% para fêmeas e machos respectivamente) e com base nesses achados sugeriu que a espécie apresenta uma alta dispersão.

Estas informações, em especial os dados obtidos para *T. albitarse* por Amarante (1991a), sugerem que há condição favorável para o fluxo gênico entre populações desta espécie e, como consequência, estas apresentariam baixa estruturação.

Portanto, a significativa estruturação genética verificada em nas análises requer uma explicação. Levando-se em conta que as populações amostradas localizam-se a distâncias geográficas relativamente altas, a amostragem e subsequente tipagem de uma nova população, próxima a uma das localidades aqui analisadas, poderia contribuir para revelar com maior robustez as questões referentes aos agrupamentos encontrados nas análises de estruturação populacional, fluxo gênico entre populações e o isolamento por distância em *T. albitarse*.

A literatura sobre a genética de populações de vespas *Trypoxylon* (*Trypargilum*) restringe-se aos dados obtidos através do uso de marcadores alozímicos por Peruquetti (2003) para *T. albitarse* e *T. rogenhoferi* e Santoni (2008) para *T. aurifrons*, *T. nitidum* e *T. lactitarse*. Apesar da baixa heterozigotidade encontrada para estas espécies utilizando estes marcadores, estes autores concluíram que as populações mostraram-se estruturadas e sugeriram que esse resultado seja reflexo do comportamento filopátrico destas vespas.

Apesar de estudos prévios indicarem que *T. albitarse* tenha uma alta dispersão (AMARANTE 1991a), os resultados obtidos no presente estudo, como diferenças nos valores de riqueza alélica e de alelos privados para cada loco entre os demes, valores significativos para os índices  $F_{st}$  e  $D_{est}$  e, indícios de endogamia e estratificação populacional devido a desvios no EHW corroboram os resultados obtidos previamente por Peruquetti (2003) e reforçam que existe estruturação em populações de *T. albitarse*, sugerindo que o fluxo gênico entre populações é limitado ou restrito e que, provavelmente, a hipótese de filopatria para a espécie seja válida.

Novos estudos envolvendo a tipagem de outras populações, preferencialmente mais próximas geograficamente aos demes amostrados neste trabalho, a obtenção de populações com maior n amostral e a utilização de um número maior de locos microssatélites, se fazem necessários para a obtenção de resultados mais conclusivos a respeito da estruturação populacional, fluxo gênico, filopatria e isolamento por distância de *T. albitarse*. O uso de regiões do DNA mitocondrial como ferramenta genética também pode ser útil para conclusões mais consistentes, além de fornecer

dados importantes para elucidar questões sobre colonização de áreas por fêmeas e testar se a dispersão na espécie é sexo-assimétrica.

## CAPÍTULO 5: Considerações finais e perspectivas

---

Mediante o estudo de indivíduos, famílias e populações de espécies do subgênero *Trypargilum* este trabalho contribuiu para a obtenção de informações relevantes sobre a história natural e dados genéticos deste grupo de vespas.

Em cerca de 350 horas de observação, foi possível obter registros comportamentais de três espécies de *Trypargilum*, focando principalmente o comportamento reprodutivo. A principal diferença observada no comportamento reprodutivo das espécies é que tanto casais de *T. agamemnon* quanto *T. aurifrons* copularam repetidamente ao longo da nidificação, principalmente antes da oviposição, ao contrário da espécie *T. nitidum*, em que apenas uma cópula foi registrada nas observações, durante o provisionamento da primeira célula. No entanto, somando essa informação a relatos obtidos em estudos prévios para esta espécie, trata-se da primeira cópula registrada para *T. nitidum*, apontando que casais da espécie provavelmente se acasalam logo após a formação do par ou nas primeiras etapas de inicialização do ninho. A execução de testes experimentais, como a remoção do macho guarda, apontou que a fêmea das três espécies estudadas nidifica exclusivamente na presença de um parceiro coespecífico, mesmo em *T. nitidum* onde cópulas não foram registradas com frequência, apontando uma aparente dependência dessas fêmeas à presença de um macho durante a nidificação, o contrário do observado para outras espécies da América do Norte, onde a presença do macho guarda parece ser facultativa ao longo da nidificação. A presença do macho em ninhos de *T. aurifrons* e *T. nitidum* foi efetiva contra inimigos naturais em tentativas de parasitismo. O fato de casais de *T. nitidum* não copularem constantemente, associado à reação da fêmea em não nidificar na ausência do parceiro e a presença do macho ser efetiva no combate contra fêmeas intrusas de Chrysididae, destaca a importância do papel do macho guarda na defesa dos ninhos desta espécie. A marcação de espécimes durante a nidificação permitiu observar troca de parceiro ao longo da construção de um ninho, bem como corroborar achados anteriores de que, ao longo da vida, um macho pode apresentar as duas estratégias reprodutivas de *Trypargilum* (guarda e patrulheiro), evidenciando que a tática adotada possivelmente seja reflexo da disponibilidade de

uma fêmea receptiva em nidificação ainda não assistida por um parceiro. Os achados envolvendo as três espécies do presente estudo, associados a uma breve discussão sobre a literatura recente, apontaram que existem particularidades comportamentais específicas e, que as espécies podem exibir estratégias de nidificação variadas. Levando em consideração que se trata de um subgênero com quase 100 espécies, das quais se conhece detalhadamente o comportamento de pouquíssimas até o momento, novos estudos sob a óptica comportamental podem ser valiosos para fins comparativos e no propósito de desvendar a origem do comportamento de guarda e pressões seletivas responsáveis pela sua manutenção ao longo do tempo evolutivo nessas espécies.

Apesar de estudos prévios envolvendo o comportamento de *T. albitarse* relatarem uma alta complexidade em seu sistema de acasalamento, com cópulas extrapar e disputas constantes entre macho guarda e patrulheiro, os resultados obtidos nas análises genéticas de parentesco em ninhos físicos de *T. albitarse* revelaram que trata-se de um sistema genético predominantemente monogâmico, com a paternidade da prole feminina totalmente ou predominantemente atribuída ao macho guarda. Outro achado importante do presente estudo está no fato de que a troca de um ou ambos os parentais ao longo da nidificação evidencia que um ninho físico, constituído de uma série de tubos de barro conectados, não representa necessariamente um ninho genético (um grupo familiar). Essas trocas de parental não se deram necessariamente no início de um novo tubo, indicando que, assim como relatado em estudos prévios, pode haver desalojamento do macho guarda, ou até mesmo da fêmea residente, após um conflito pela posse de seu posto em um ninho ativo.

Estudos prévios sugeriram que espécies de *Trypargilum*, incluindo *T. albitarse*, têm alta capacidade de dispersão; no entanto, os resultados obtidos com o uso de marcadores microssatélites no estudo populacional de *T. albitarse*, tal como em estudos prévios utilizando marcadores alozímicos, apontaram que há estruturação genética populacional, reforçando a hipótese de comportamento filopátrico da fêmea desta espécie. Levando em conta a grande distância geográfica entre as populações amostradas, as estimativas obtidas nas comparações par a par para diferenciação genética entre os demes evidenciaram que provavelmente a amostragem nos demes

LAV e GUA foi baixa para a obtenção de estimativas confiáveis. Novas amostragens, englobando novas populações, um tamanho amostral maior e um número maior de locos podem fornecer dados para a obtenção de resultados mais conclusivos a respeito da estruturação genética de populações de *T. albitarse*. Além disso, a amostragem de uma nova população, próxima a algum dos demes já amostrados podem reforçar se o isolamento por distância realmente não é válido a espécie. Estudos envolvendo regiões do DNA mitocondrial se fazem extremamente necessários, pois podem ser úteis no intuito de desvendar como se dá a colonização de áreas pelas fêmeas, determinar o provável centro de origem e dispersão da espécie e, mediante análises comparativas com os resultados obtidos com os marcadores microssatélites, testar se há dispersão sexo-assimétrica em *T. albitarse*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALCOCK, J. Territorial behavior by males of *Philanthus multimaculatus* (Hymenoptera: Sphecidae). **Animal Behavior**, v.23, p.889-895, 1975.

ALCOCK, J. Notes on male mate-locating behavior in some bees and wasps of Arizona. **Pan-Pacific Entomology**, v.54, p.215-225, 1978.

ALCOCK, J. Adaptive mate-guarding by males of *Ontholestes cingulatus* (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Insect Behavior**, v.4, p.763-771, 1991.

ALCOCK, J. Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.39, p.1-21, 1994.

ALCOCK, J. *et al* The ecology and evolution of male reproductive behaviour in the bees and wasps. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.64, p.293-326, 1978.

ALEXANDER, B. A. An exploratory analysis of cladistic relationship within the superfamily Apoidea, with special reference to sphecid wasps (Hymenoptera). **Journal of Hymenoptera Research**, v.1, p.25-61, 1992.

ALTMANN, J. Observational study of behavior: Sampling methods. **Behaviour**, v.49, p.227-267, 1974.

ALVES-DOS-SANTOS, I. Trap-nesting bees and wasps on university campus in São Paulo, Southeastern Brazil (Hymenoptera: Aculeata). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.76, p.328-334, 2003.

ALMEIDA, J. C. **Biologia de nidificação e estrutura sociogenética de ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae): comportamento de guarda do macho e paternidade.** 88 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

ALMEIDA, J. C. *et al.* A. Isolation and characterization of microsatellite loci for the mud-dauber wasp *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius, 1804 (Hymenoptera: Crabronidae). **European Journal of Entomology**. v.110, p.541-543, 2013.

AMARANTE, S. T. P. **Biologia e comportamento reprodutivo de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* F. (Hymenoptera: Sphecidae).** 109p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991a.

AMARANTE, S. T. P. Three new Neotropical species of *Trypoxylon (Trypargilum)* (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.35, p.429-437, 1991b.

AMARANTE, S. T. P. *Trypoxylon (Trypoxylon) mojuba* sp. n., an unusual Trypoxylini from South America (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.39, p.157-160, 1995.

AMARANTE, S. T. P. A synonymic catalog of the Neotropical Crabronidae and Sphecidae (Hymenoptera, Apoidea). **Arquivos de Zoologia**, v.37, p.1-139, 2002.

AMARANTE, S. T. P. Addendum and corrections to a synonymic catalog of Neotropical Crabronidae and Sphecidae. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.45, p.15-32, 2005a.

AMARANTE, S. T. P. On the Systematics of *Trypoxylon scrobiferum* Richards and *T. anapaikae* Amarante with the recognition of a new species group in the subgenus *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae: Trypoxylini). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.45, p.91-101, 2005b.

ANTROPOV, A. V. Another nest-guarding male of *Pison*. **Sphecos**, v.20, p.20, 1990.

ARAÚJO, M. S.; GONZAGA, M. O. Individual specialization in the hunting wasp *Trypoxylon (Trypargilum) albonigrum* (Hymenoptera, Crabronidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.61, p.1855-1863, 2007.

ARAÚJO, S. M. S. R. **Contribuição a citogenética de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius, 1804 (Hymenoptera, Sphecidae): I. Dinâmica dos cromossomos B II. Estudos da NOR e nucléolos**. Campinas, 2002, 102p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.

ARAÚJO, S. M. S. *et al.* The B chromosome system of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae) 1. Banding analysis. **Cytobios**, v.101, p.7-13, 2000.

ARAÚJO, S. M. S. R. *et al.* Integration of a B chromosome into the genome of a wasp. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, v.268, p.1127-1131, 2001.

ARAÚJO S, M. S. R. *et al.* Integration of a B chromosome into the genome of a wasp, revisited. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, v.269, p.1475-1478, 2002a.

ARAÚJO, S. M. S. R. *et al.* Genetic load caused by variation in the amount of rDNA in a wasp. **Chromosome Research**, v.10, p.607-613, 2002b.

ARAÚJO V.A.; MOREIRA, J.; LINO-NETO J. Structure and ultrastructure of the spermatozoa of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). **Micron**, v.40, p.719-23, 2009.

ASSIS, J. M. F.; CAMILLO, E. Diversidade, sazonalidade e aspectos biológicos de vespas solitárias (Hymenoptera: Sphecidae: Vespidae) em ninhos armadilhas na região

de Ituiutaba, MG. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, p.335–347, 1997.

BANKS, D. Male nest defense in the digger wasp *Cerceris binodis* (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of Hymenoptera Research**, v.4, p.77-79, 1995.

BERTON, L.; CASTANHO, M. J.; BUSCHINI, M. L. T. Fuzzy approach in the survival rate of *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* (Hymenoptera: Crabronidae). **Ambiência**, v.5, p.419-431, 2009.

BIRD, C. E. *et al.* Detecting and measuring genetic differentiation. *In*: KOENEMANN, S.; HELD, C.; SCHUBART, C. (Ed.). **Crustacean issues**: phylogeography and population genetics in crustacea. Boca Raton: CRC Press, 2011. p.31-55.

BOHART, R. M.; MENKE, A. S. **Sphecid Wasps of the World: a Generic Revision**. Berkeley. University of California Press. 1976. 695p.

BORGES, F. B.; BLOCKTEIN, B. Aspectos da biologia de cinco espécies de *Trypoxylon* (Hymenoptera, Sphecidae, Trypoxylini) no Rio Grande do Sul. **Biociências**, v.9, p.51-62, 2001.

BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **An introduction to the study of insects**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia. Saunders College Publishing. 1989. 875p.

BROCKMANN, H. J. Diversity in the nesting behavior of mud-daubers *Trypoxylon politum* SAY (Sphecidae). **Florida Entomologist**, v.63, p.53-64, 1980.

BROCKMANN, H, J. Father of the brood. **Natural History Magazine**, v.97, p.32-37, 1988.

BROCKMANN, H, J. Male behavior, courtship and nesting in *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.65, p.66-84, 1992.

BROCKMANN, H. J. Variable life-story and emergence patterns of the pipe-organ mud-daubing wasp, *Trypoxylon politum* (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, V.77, p.503-527, 2004.

BROCKMANN, H. J.; GRAFEN A. Mate conflict and male behavior in a solitary wasp, *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Hymenoptera: Sphecidae). **Animal Behavior**, v.37, p.232-255, 1989.

BROCKMANN, H. J.; GRAFEN, A. Sex ratios and life-history patterns of a solitary wasp, *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Hymenoptera:Sphecidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.30, p.7-27, 1992.

BROTHERS, D. J. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). **Zoologica Scripta**, v.28, p.233-249, 1999.

BRUCH, C. Apuntes sobre costumbres de *Trypoxylon palliditarse* Sauss. (Hymenoptera). **Anales de la Sociedad Científica Argentina**, v.114, p.49-61, 1932.

BUSCHINI, M. L. T. Species diversity and community structure in trap-nesting bees in Southern Brazil. **Apidologie**, v.37, p.58-66, 2006.

BUSCHINI, M. L. T. Life-history and sex allocation in *Trypoxylon* (syn. *Trypargilum*) *lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.45, p.206-213, 2007.

BUSCHINI, M. L. T.; BERGAMASCHI, A.C.B. Strongly female-biased sex allocation in a trivoltine population of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *opacum* Brèthes (Hymenoptera, Crabronidae). **Acta Zoologica**, v.91, p.433-439, 2010.

BUSCHINI, M. L. T.; BERGAMASCHI, A. C. B. Sex ratio and parental investment in *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *agememnon* Richards (Hymenoptera, Crabronidae). **Brazilian Journal of Biology**. *In press*.

BUSCHINI, M. L. T.; BORBA, N. A.; BRESCOVIT, A. D. Patterns of prey selection of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *lactitarse* Saussure (Hymenoptera: Crabronidae) in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.519-528, 2008.

BUSCHINI, M. L. T.; BORBA, N. A.; BRESCOVIT, A. D. Prey selection in trap-nesting wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *opacum* Brèthes (Hymenoptera; Crabronidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.70, p.529-536, 2010.

BUSCHINI M. L. T. *et al.* Spiders used as prey by the hunting wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *agememnon* Richards (Hymenoptera: Crabronidae). **Zoological Studies**, v.49, p.169-175, 2010.

BUSCHINI, M. L. T.; DONATTI, A. J. Nesting behavior of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *agememnon* Richards (Hymenoptera: Crabronidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.72, p.353-362, 2012.

BUSCHINI, M. L. T.; FARJADO, S. Biology of the solitary wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *agememnon* Richards 1934 (Hymenoptera: Crabronidae) in trap-nests. **Acta Zoologica**, v.91, p.426-432, 2010.

BUSCHINI, M. L. T.; NIESING, F.; WOLFF, L. L. Nesting biology of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae) in trap-nests in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.66, p.161-171, 2006.

BUSCHINI, M. L. T.; WOISKI, T. D. Alpha-beta diversity in trap-nesting wasps (Hymenoptera: Aculeata) in Southern Brazil. **Acta Zoologica**, v.89, p.351-358, 2008.

BUSCHINI, M. L. T.; WOLF, L. L. Notes on the biology of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *opacum* Brèthes (Hymenoptera; Crabronidae) in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.66, p.915-926, 2006.

BUYS, S. C. Last instar larva of *Trypoxylon (Trypoxylon) maidli*. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.20, p.447-449, 2003.

BUYS, S. C. Description of the last instar larva of *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius (Hymenoptera, Crabronidae) from Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, p.696-698, 2005.

BUYS, S. C. Morphology of the last instar larva of *Trypoxylon (Trypargilum) aestivale* Richards, 1934, with notes on preys and parasitoids (Hymenoptera: Crabronidae). **Mitteilungen des Internationalen Entomologischen Vereins**, v.32, p.143-150, 2007.

CAMERON, S. A. Brood care by males of *Polistes major* (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.59, p.186-189, 1986.

CAMILLO, E. Bionomics of *Trypoxylon (Trypargilum) antropovi* and *Trypoxylon (Trypargilum) aestivale* (Hymenoptera: Sphecidae). **Iheringia**, v.87, p.29-36, 1999.

CAMILLO, E.; BRESCOVIT, A. D. Aspectos biológicos de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae) em ninhos armadilhas, com especial referência a suas presas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, p.251-262, 1999a.

CAMILLO, E.; BRESCOVIT, A. D. Spiders (Araneae) captured by *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* (Hymenoptera: Sphecidae) in Southeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v.47, p.151-162, 1999b.

CAMILLO, E.; BRESCOVIT, A. D. Spider prey (Araneae) of *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* (Hymenoptera, Sphecidae) in Southeastern Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v.48, p.647-656, 2000.

CAMILLO, E. *et al.* Biological observation on *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* Saussure in Southeastern Brazil (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.37, p.769-778, 1993.

CAMILLO, E.; GARÓFALO, C. A.; SERRANO, J. C. Observações sobre a biologia de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.299-310, 1994.

CAMILLO, E. *et al.* Diversidade e abundância sazonal de abelhas e vespas solitárias em ninhos armadilhas (Hymenoptera, Apocrita, Aculeata). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.39, p.459-470, 1995.

CHARNOV, E. L. **The theory of the sex allocation**. Princeton. Princeton University Press. 1982. 355p.

COOK, J. M. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. **Heredity**, v.71, p.421-435, 1993.

COVILLE, R. E. Biological observations on *Trypoxylon (Trypargilum) orizabense* Richards in Arizona (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.52, p.613-620, 1979.

COVILLE, R. E. Biological observations on three *Trypoxylon* wasps in the subgenus *Trypargilum* from Costa Rica: *T. nitidum schultessi*, *T. saussurei* and *T. lactitarse* (Hymenoptera: Sphecidae). **Pan-Pacific Entomologist**, v.57, p.332-340, 1981.

COVILLE, R. E. **Wasps of the genus *Trypoxylon* subgenus *Trypargilum* in the North America**. Berkeley and Los Angeles. University of California Press. 1982. 147p.

COVILLE, R. E.; COVILLE, P. L. Nesting Biology and male behavior of *Trypoxylon (Trypargilum) tenocitlan* in Costa Rica (Hymenoptera: Sphecidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.73, p.110-119, 1980.

COVILLE, R. E.; GRISWOLD, C. E. The nesting biology of *Trypoxylon xanthandrum* (Hymenoptera: Sphecidae) in central America, a hunting wasp specializing on spiders of the family Senoculidae. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.56, p.205-216, 1983.

COVILLE, R. E.; GRISWOLD, C. Biology of *Trypoxylon (Trypargilum) superbum* (Hymenoptera: Sphecidae), a spider-hunting wasp with extended guarding of the brood by males. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.57, p.365-376, 1984.

COVILLE, R. E.; GRISWOLD, C.; COVILLE, P. L. Observations on the Nesting Biology and Behavior of *Trypoxylon (Trypargilum) vagulum* (Hymenoptera: Sphecidae) in Costa Rica. **Pan-Pacific Entomology**, v.76, p.28-48, 2000.

COWAN, D. P.; STAHLHUT, J. K. Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.101, p.10374-10379, 2004.

CRESPI, B. J.; YANEGA, D. The definition of eusociality. **Behavioral Ecology**, v.6, p.109-115, 1995.

CROSS, E. A.; SMITH, M. G.; BAUMAN, T. R. Bionomics of the organ-pipe mud-dauber, *Trypoxylon politum* (Hymenoptera: Sphecoidea). **Annals of the Entomological Society of America**, v.68, p.901-916, 1975.

CROZIER, R. H.; PAMILO, P. **Evolution of social insect colonies. Sex allocation and kin selection**. Oxford. Oxford University Press. 1996. 320p.

DALY, M. The cost of mating. **American Naturalist**, v.112, p.771-774, 1978.

DARWIN, C. R. **The descent of man, and selection in relation to sex**. 2<sup>nd</sup> ed. London. Murray. 1871. 693p.

DEBEVEC, A. H.; CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. Identifying the sister group to the bees: a molecular phylogeny of Aculeata with an emphasis on the superfamily Apoidea. **Zoologica Scripta**, v.41, p.527-535, 2012.

DOMÍNGUEZ, K.; JIMÉNEZ, M.L. Composition of spider prey captured by the wasp *Trypoxylon (Trypargilum) tridentatum tridentatum* in two habitats in an oasis in Baja California Sur, Mexico. **Canadian Entomologist**, v.140, p.388-392, 2008.

DUCHATEAU, M. J.; MARIEN, J. Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. **Insect Sociaux**, v.42, p.255-266, 1995.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Blackwell Publishing, Ltd. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p. 2611-2620, 2005.

EVANS, H. E.; WEST-EBERHARD, M. J. **The Wasps**. Ann Arbor. The University of Michigan Press. 1970. 265p.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DAN restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin v. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FERNANDES-SALOMÃO T. M. *et al.* The first internal transcribed spacer (ITS-1) from *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. **Insect Sociaux**, v.52, p.11-18, 2005.

FLANDERS, S. E. On the sexuality and sex ratios of hymenopterous populations. **American Naturalist**, v.93, p.489-494, 1965.

FOX, E. G. P. *et al.* The larval morphology and nest habits of *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl 1884 (Insecta: Hymenoptera: Crabronidae). **Zootaxa**, v.3251, p.47-56, 2012.

FREEMAN, B. The dynamics in Trinidad of the Sphecid wasp *Trypoxylon palliditarse*: a thompsonian population? **Journal of Animal Ecology**, v.50, p.563-572, 1981.

FRITZ, M.; GENISE, J. A. Notas sobre nidos de barro de Sphecidae (Hymenoptera) constructores, inquilinos, parasitoides, cleptoparasitos y dentritivoros. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v.39, p.67-81, 1980.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia agrícola**. Piracicaba. FEALQ. 2002. 920p.

GARCIA, M. V. B.; ADIS J. Comportamento de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae) em uma floresta inundável de várzea na Amazônia Central. **Amazoniana**, v.13, p.259-282, 1995.

GARÓFALO, C. A.; MUCCILLO, G.; SERRANO, J. C. Biological observations on *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* Saussure in Southeastern Brazil (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.37, p.769-778, 1993.

GARÓFALO, C. A.; SERRANO, J. C.; MUCCILLO, G. Diversidade e abundancia sazonal de abelhas e vespas solitárias em ninhos armadilhas (Hymenoptera, Apocrita, Aculeta). **Revista Brasileira de Entomologia**. v.19, p.459-470, 1995.

GAULD, I.; BOLTON, B. **The Hymenoptera**. London. Oxford University Press. 839p. 1996.

GAZOLA, A. L. **Ecologia de vespas e abelhas solitárias (Hymenoptera: Apoidea) que nidificam em ninhos armadilha em dois fragmentos de floresta estacional semidecidual no Estado de São Paulo**. 106p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

GAZOLA, A. L.; GARÓFALO, C. A. Trap-nesting bees (Hymenoptera: Apoidea) in forest fragments of the State of São Paulo, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.607-622, 2009.

GENARO, J. A. Estructura del nido y capullo de *Trypoxylon (Trypargilum) subimpressum* (Hymenoptera: Sphecidae). **Caribbean Journal of Science**, v.32, p.240-243, 1996.

GENARO, J. A. Primer registro de *Trypoxylon mexicanum* para Hispaniola (Hymenoptera: Apoidea: Crabronidae). **Insecta Mundi**, v.6, p.1-5, 2007.

GENARO, J. A. Sobre la presencia de *Trypoxylon (Trypargilum) saussurei* em las Antillas (Hymenoptera: Apoidea; Crabronidae). **Solenodon**, v.7, p.46-51, 2008.

GENARO, J. A.; ALAYÓN, G. Las presas (Araneae) de *Trypoxylon (Trypargilum) subimpressum* (Hymenoptera: Sphecidae) em Cuba. **Revista de Biología Tropical**, v.42, p.353-356, 1994.

GENARO, J. A.; SÁNCHEZ, C. S.; ALAYÓN G. Notas sobre la conducta de nidificación de *Trypoxylon (Trypargilum) subimpressum* Smith (Hymenoptera: Sphecidae). **Caribbean Journal of Science**, v.25, p.228-229, 1989.

GERBER, H. S.; KLOSTERMEYER, E. C. Sex control by bees: a voluntary act of egg fertilization during oviposition. **Science**, v.167, p.82-84, 1970.

GOMES, L. F. **Estudos citogenéticos em vespas do gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae, Trypoxylonini)**. 80p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

GOMES, L. F.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O. Cytogenetics analysis of three species of *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). **Revista Brasileira de Genética**, v.18, p.173-176, 1995.

GOMES, L. F.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O. Karyotype evolution in wasps of the genus *Trypoxylon* (subgenus *Trypargilum*) (Hymenoptera, Sphecidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.177-183, 1997.

GOODNIGHT, K. F.; QUELLER, D. C. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationships using genetic markers. **Molecular Ecology**, v.8, p.1231-1234, 1999.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices Version 2.9.3**. Disponível em: <http://www.unilch/izea/software/fstat.html>. 2001.

GOULET, H.; HUBER J. T. **Hymenoptera of the World: An identification guide to families**. Agriculture Canada, Ottawa. 1993. 753p.

GRAFEN, A. Split sex ratios and the evolutionary origins of eusociality. **Journal of Theoretical Biology**, v.122, p.95-121, 1986.

HAMILTON, W. D. The genetical evolution of social behaviour. **Journal of Theoretical Biology**, v.7, p.1-52, 1964.

HARTMAN, C. Observations on the habits of some solitary wasps of Texas. **Bulletin of the University of Texas**, v.65, p.1-72, 1905.

HEDRICK, P. W.; GADAU, J.; PAGE, R. E. Genetic sex determination and extinction. **Trends in Ecology & Evolution**, v.21, p.55-57, 2006.

HEIMPEL, G. E.; BOER, J. G. Sex determination in the Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, v.53, p.209-230, 2008.

HOOK, A. W. Notes on the nesting and mating behavior of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *spinosum* (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.57, p.534-535, 1984.

HOOK, A. W.; MATTHEWS, R. W. Nesting biology of *Oxybelus sericeus* with a discussion of nest guarding by male sphecidae wasps (Hymenoptera). **Psyche**, v.87, p.21-37, 1980.

HUNTER, F. M. *et al.* Why do females copulate repeatedly with one male? **Trends in Ecology & Evolution**, v.8, p.21-26, 1993.

JANVIER, H. Recherches biologiques sur les predateurs du Chili. **Annales de Sciences Naturelles**, v.11, p.67-207, 1928.

JAYASHINGH, D. B.; FREEMAN, B. E. Trap-nesting solitary aculeates (Insecta: Hymenoptera) in St. Catherine Jamaica. **Caribbean Journal of Science**, v.15, p.69-78, 1980a.

JAYASHINGH, D. B.; FREEMAN, B. E. The comparative populations dynamics of eight solitary bees and wasps (Aculeata: Apocrita: Hymenoptera) trap-nested in Jamaica. **Biotropica**, v.12, p.214-219, 1980b.

JOST, L.  $G_{ST}$  and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v.17, p.4015-4026, 2008.

KALINOWSKI, S. T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v.5, p.539-543, 2004.

KALINOWSKI, S. T. HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.187-189, 2005.

KIMSEY, L. S. Nesting and male behavior in *Dynatus nigripes spinolae* (Lepeletier) (Hymenoptera, Sphecidae). **Pan-Pacific Entomology**, v.54, p.65-68, 1978.

KONOVALOV, D. A.; MANNING, C.; HENSHAW, M. T. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.779-782, 2004.

KROMBEIN, K. V. **Trap-nesting wasps and bees: life histories, nests and associates**. Washington. Smithsonian Press. 1967. 469p.

KURCZEWSKI, F. E. A first Florida record and note on the nesting of *Trypoxylon (Trypargilum) texense*, Saussure (Hymenoptera: Sphecidae). **Florida Entomologist**, v.46, p.243-245, 1963.

KURECK, I. M.; NOCOLAI, B.; FOITZIK, S. Similar performance of diploid and haploid males in an ant species without inbreeding avoidance. **Ethology**, v.119, p.360-367, 2013.

LEWIS JR, W. M. The cost of sex. In: STERNS, S.C. (Ed.). **The evolution of sex and its consequences**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1987. p.33-57.

LIN, C. S. Biology of *Trypoxylon spinosum*, with notes on *T. texense* and *T. politum* at Lake Texoma (Hymenoptera: Sphecidae: Trypoxyloninae). **The Wasmann Journal of Biology**, v.27, p.125-133, 1969.

LOMHOLDT, O. On the origin of the bees (Hymenoptera: Apidae, Sphecidae). **Entomologica Scandinavia**, v.13, p.185-190, 1982.

LOYOLA, R. D.; MARTINS, R. P. Trap-nest occupation by solitary wasps and bees (Hymenoptera: Aculeata) in a forest urban remnant. **Neotropical Entomology**, v.35, p.41-48, 2006.

MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p.209-220, 1967.

MATTEWS, R. W. Biology of a new *Trypoxylon* that utilizes nests of *Microstigmus* in Costa Rica (Hymenoptera: Sphecidae). **Pan-Pacific Entomologist**, v.59, p.152-162, 1983.

MATTHEWS, R. W.; MATTHEWS, J. R. A note on *Trypargilum arizonense* in trap nests from Arizona, with a review of prey preferences and cocoon structure in the genus (Hymenoptera: Sphecidae). **Psyche**, v.75, p.285-293, 1968.

MELO, G. A. R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera): with emphasis on the crabronid wasps. **Scientific Papers of the Natural History Museum, University of Kansas**, v.14, p.1-55, 1999.

MELO, G. A. R. Comportamento social em vespas da família Sphecidae (Hymenoptera, Apoidea). In: MARTINS, R. P.; LEWINSOHN, T. M.; BARBEITOS, M. S. (Eds.). **Ecologia e comportamento de Insetos**, Rio de Janeiro. Série Oecologia Brasiliensis. p.85-130, 2000.

MELO, G. A. R.; GONÇALVES, R. B. **Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato)**. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, p.153-159, 2005.

MENEZES, R. S. T. *et al.* Molecular characterization of constitutive heterochromatin in three species of *Trypoxylon* (Hymenoptera, Crabronidae, Trypoxylini) by CMA<sub>3</sub>/DAPI staining. **Comparative Cytogenetics**, v.5, p.71-80, 2011.

METCALF, R. A.; MARLIN, J. C.; WHITT, G. S. Low levels of genetic heterozygosity in Hymenoptera. **Nature**, v.257, p.792-794, 1975.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees. A comparative study**. Cambridge. The Belknap Press. 1974. 404p.

MOLUMBY, A. Why make daughters larger? Maternal sex-allocation and sex-dependent selection for body size in a mass-provisioning wasp, *Trypoxylon politum*. **Behavioral Ecology**, v.8, p.279-287, 1997.

MORATO, E. F.; AMARANTE, S. T. P.; SILVEIRA, O. T. Avaliação ecológica rápida da fauna de vespas (Hymenoptera: Aculeata) do Parque Nacional da Serra do Divisor, Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, v.38, p.789-798, 2008.

MOREIRA, P. A. **Morfologia do sistema reprodutor masculino e aspectos do comportamento reprodutivo de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera:**

**Crabronidae**). 48p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MOREIRA, P. A. *et al.* Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). **Neotropical Entomology**, v.37, p.429-435, 2008.

MUSICANTE, M. L.; SALVO, A. Nesting biology of four species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera: Crabronidae) in Chaco Serrano woodland, Central Argentina. **Revista de Biologia Tropical**, v.58, p.1177-1178, 2010.

NASCIMENTO, A. L. O. **Vespas solitárias (Hymenoptera: Aculeata) ocupando ninhos-armadilha no Parque Estadual da Ilha Anchieta, Ubatuba, SP**. 61p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O'NEILL, K. M. **Solitary Wasps: Natural History and Behavior**. Ithaca. Cornell University Press. 2001. 406p.

PAETZEL, M. M. Behaviour of the male *Trypoxylon rubrocinctum* (Hymenoptera: Sphecidae). **Pan-Pacific Entomologist**, v.49, p.26-30, 1973.

PARKER, G. A. Sperm competition and its evolutionary consequence in the insects. **Biological Reviews**, v.45, p.525-568, 1970.

PARKER, G. A. Sexual selection and sexual conflict. *In*: BLUM, M. S.; BLUM, N. A. (Eds.). **Sexual selection and reproductive competition in insects**. New York. Academic Press. 1979. p.123-166.

PARKER, G. A. Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Strategies. *In*: SMITH R. L. (ed). **Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems**. London. Academic Press. 1984. p.2-60.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.288-295, 2006.

PECKHAM, D. J. Reduction of miltogrammine cleptoparasitism by male *Oxybelus subulatus* (Hymenoptera: Sphecidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.70, p.823-828, 1977.

PECKHAM, D. J.; KURCZEWSKI, F. E.; PECKHAM, D. B. Nesting behavior of Nearctic species of *Oxybelus* (Hymenoptera: Sphecidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.66, p.647-661, 1973.

PECKHAM, G. W.; PECKHAM, E. G. Notes on the habits of *Trypoxylon rubrocinctum* and *Trypoxylon albopilosum*. **Psyche**, v.7, p.303-306, 1895.

PECKHAM, G. W.; PECKHAM, E. G. On the instincts and habits of solitary wasps. **Wisconsin Geological and Natural History Survey**, v.2, p.1-245, 1898.

PÉREZ-MALUF, R. **Biologia de vespas e abelhas solitárias em ninhos armadilhas, em Viçosa – MG**. Viçosa, 1992, 87p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

PERUQUETTI, R. C. **Aspectos da biologia, estrutura populacional e parentesco intranidal em vespas do gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Sphecidae)**. São Carlos. 59p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2003.

PERUQUETTI, R. C. Use of trap nests with a Neotropical mud-dauber, *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius, 1804 (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.78, p.84-87, 2005.

PERUQUETTI, R. C.; DEL LAMA, M. A. Alocação sexual e seleção sexo-dependente para tamanho de corpo em *Trypoxylon rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, p.581-588, 2003.

PITILIN, R. B.; ARAÚJO, M. S.; BUSCHINI, M. L. T. Individual Specialization in the hunting-wasp *Trypoxylon (Trypargilum) agamemnon* Richards (Hymenoptera: Crabronidae). **Zoological Studies**, v.51, p.655-662, 2012.

PRITCHARD, J. K; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.

PULAWSKI, W. J. **Catalog of Sphecidae sensu lato**. 2013. Disponível em: <[http://research.calacademy.org/ent/catalog\\_sphecidae/16210](http://research.calacademy.org/ent/catalog_sphecidae/16210)>. Acesso em: 06/2013.

QUELLER, D. C; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology & Evolution**. v.8, p.285-288, 1993.

RAU, P. Field studies on the behavior of the non-social wasps. **Transactions of the Academy of Science of St Louis**, v.25, p.325-489, 1928.

RAU, P. **The jungle bees and wasps of Barro Colorado Island**. St. Louis. Von Hoffmann Press. 1933. 324p.

RAU, P.; RAU, N. The biology of mud-daubing wasps as revealed by the contents of their nests. **Journal of Animal Behavior**, v.6, p.27-63, 1916.

RAYMOND, M.; ROUSSET F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-24, 1995.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v.43. p.223-225, 1989.

RICHARDS, O. W. The American species of the genus *Trypoxylon*. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, v.82, p.173-362, 1934.

RICHARDS, O. W. Species of *Trypoxylon* Latreille (Hymenoptera: Sphecidae) from Cuba. **Proceedings of the Royal Entomological Society of London**, v.38, p.121-124, 1969.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.103-106, 2008.

SANCHEZ, S. M. S. R; POMPOLO, S. G. Imitate to integrate: reviewing the pathway for B chromosome integration in *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.106, p.398-401, 2004.

SANDHOUSE, G. A. A review of the nearctic wasps of the genus *Trypoxylon* (Hymenoptera: Sphecidae). **The American Midland Naturalist**, v.24, p.133-176, 1940.

SANTONI, M. M. **Biologia de Nidificação e Estrutura Sociogenética Intranidal em Espécies de *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae)**. 150p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

SANTONI, M. M; BRESOVIT, A. D.; DEL LAMA, M. A. Ocupação diferencial do habitat por vespas do gênero *Trypoxylon (Trypargilum)* Latreille (Hymenoptera, Crabronidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, p.107-114, 2009.

SANTONI, M. M.; DEL LAMA, M. A. Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons* Shuckard (Hymenoptera, Crabronidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.51, p.369-376, 2007.

SCHER R. **Diversidade Cariotípica em uma População de *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* (Hymenoptera, Sphecidae) do Parque Florestal do Rio Doce (MG)**. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

SCHER, R.; POMPOLO, S. G. Evolutionary dynamics of the karyotypes of the wasp *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* from the Rio Doce State Park, Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.307-311, 2003.

SERRRANO, J. C.; GARÓFALO, C. A. Utilização de ninhos artificiais para o estudo bionômico de abelhas e vespas solitárias. **Ciência e Cultura**, v.30. p.597, 1978.

SHARKEY, M. J. Phylogeny and Classification of Hymenoptera. **Zootaxa**, v.1668, p.521-548, 2007.

SMITH, R. L. Repeated copulation and sperm precedence: paternity assurance for a male brooding water bug. **Science**, v.205, p.1029-1031, 1979.

STAHLHUT, J. K.; COWAN, D. P. Inbreeding in a natural population of *Euodynerus foraminatus* (Hymenoptera: Vespidae), a solitary wasp with single-locus complementary sex determination. **Molecular Ecology**, v.13, p.631-38, 2004.

TEMPLETON, A. R. **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva**. Ribeirão Preto. SBG. 2011. 705p.

THORNHILL, R.; ALCOCK, J. **The evolution of insect mating systems**. Cambridge. Harvard University Press. 1983. 547p.

TRIVERS, R. L. Parental investment and sexual selection. *In*: CAMPBELL B. (Ed.). **Sexual selection and Descent of man: 1871-1971**. London. Heinemann. 1972. p.136-179.

TRIVERS, R. L.; HARE, H. Haplodiploidy and the evolution of the social insects. **Science**, v.191, p.249-263, 1976.

TSUNEKI, K. Gleanings on the bionomics of the east-asiatic non-social wasps (Hymenoptera) VI. Some species of Trypoxyloninae. **Etizenia**, v.45, p.1-20, 1970.

WAAGE, J. K. Dual function of the damselfly penis: sperm removal and transfer. **Science**, v.203, p.916-918, 1979.

WALKER, W. F. Sperm utilization strategies in nonsocial insects. **American Naturalist**, v.115, p.780-799, 1980.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**. v.10, p.506-513, 1991.

WEBSTER, M. S.; REICHART, L. Use of microsatellites for parentage and kinship analyses in animals. **Methods in Enzymology**, v.395, p.222-238, 2005.

WEST-EBERHARD, G. The natural history and behaviour of the wasp *Trygonopsis cameronii* Kohl (Sphecidae). **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, v.125, p.295-328, 1974.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge. Harvard University Press. 1971. 548p.

WRIGHT, S. Genetical structure of populations. **Nature**, v.166, p.247-249, 1950.

ZAYED, A. Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. **Heredity**, v.93, p.627-630, 2004.

ZAYED, A.; PACKER, L. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.102, p.10742-10746, 2005.

## ANEXO I.

*Eur. J. Entomol.* **110**(3): 541–543, 2013  
<http://www.eje.cz/pdfs/110/3/541>  
 ISSN 1210-5759 (print), 1802-8829 (online)

## Isolation and characterization of microsatellite loci for the mud-dauber wasp *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)

JULIANO DA COSTA ALMEIDA<sup>1</sup>, ANTONIO CARLOS BRAGATO BERGAMASCHI<sup>1</sup>, ALEXANDRA SANCHES<sup>2</sup>,  
 TERUMI HATANAKA<sup>1</sup> and MARCO ANTONIO DEL LAMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil; e-mails: juliano03@gmail.com; caito\_bio@yahoo.com.br; hterumi@yahoo.com.br; dmdl@ufscar.br

<sup>2</sup> Departamento de Ecologia, Universidade Estadual Paulista, 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil; e-mail: lelesanches@gmail.com

**Key words.** Hymenoptera, Crabronidae, *Trypoxylon albitarse*, microsatellites, genetic characterization

**Abstract.** This paper describes the characterization of a set of nine microsatellite markers for the pipe-organ mud-dauber wasp, *Trypoxylon albitarse* F. (Hymenoptera: Crabronidae), a common solitary wasp species in Brazil. Eight of the nine loci described were found to be polymorphic. The number of alleles ranged from three to 11. Observed and expected heterozygosity on the population level ranged from 0.135 to 0.891 and 0.177 to 0.865, respectively. Genotypic analyses revealed no deviations from Hardy-Weinberg equilibrium or linkage disequilibrium after sequential Bonferroni correction. Cross-species amplification was also tested for nine related species and positive amplifications were found in most of the assays. These markers will be useful in studies involving relatedness analysis and investigations of the population genetics of these wasps.

### INTRODUCTION

*Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae) is a diverse genus of solitary wasps. Species of the subgenus *Trypargilum* appear to have several distinctive features, such as nest architecture, cocoon morphology and prey preference (Coville, 1982). Some species construct mud nests, while others utilize pre-existing cavities that are divided into a linear series of cells by mud partitions. The female is responsible for nesting activities and supplies brood cells with paralyzed spiders. A single egg is laid on the abdomen of one of the last spiders stored. A mud partition is placed to seal each cell. Once the nest is completed, the female seals the tube entrance with a thicker plug of mud (Coville, 1982; Brockmann, 1992).

*Trypargilum* males exhibit guarding behavior during the time the nest is being provisioned by the female (Coville & Coville, 1980; Brockmann, 1992). Highly polymorphic molecular (DNA) markers, such as microsatellites, are useful tools in attempting to determine the association between guarding behaviour and paternity of the brood (Queller et al., 1993; Hughes, 1998). In the family Crabronidae, such markers have only been developed for the European beewolf, *Philanthus tri-angulum* (F.) (subfamily Philanthinae) (Kaltenpoth et al., 2004) and the thin-waisted social wasp, *Microstigmus nigrophthalmus* Melo (subfamily Pemphredoninae) (Lucas et al., 2009). For our own purposes, it was therefore necessary to develop specific markers for *Trypoxylon*, which might also prove useful in familial and population genetics studies and provide valuable insights regarding the mating system of these wasps. The aim of the present study was thus to characterize microsatellite loci for the pipe-organ mud-dauber wasp, *T. albitarse* F., a common solitary wasp species in Brazil, the nests of which are often found in the walls of man-made constructions. Additionally, these loci were tested across nine other wasp species to test for cross amplification of the markers.

### MATERIAL AND METHODS

An enriched partial genomic DNA library was developed essentially as described by Hamilton et al. (1999). DNA was extracted using the phenol-chloroform protocol according to Fernandes-Salomão et al. (2005). DNA extracted from a single individual was digested with restriction enzymes *RsaI*, *Bstul* and *XmnI* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). After agarose gel electrophoresis, fragments between 400 and 1000 bp were purified from the gel (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit, Promega). For enrichment, fragments were hybridized with a mix of eight biotinylated oligonucleotides [(AAAC)<sub>6</sub>, (AAAG)<sub>6</sub>, (AATC)<sub>6</sub>, (AATG)<sub>6</sub>, (ACCT)<sub>6</sub>, (ACAG)<sub>6</sub>, (ACTC)<sub>6</sub>, (ACTG)<sub>6</sub>], where after the hybridized fragments were recovered on streptavidin-coated magnetic beads (Streptavidin Magnesphere Paramagnetic Particles, Promega, Madison, USA). Enriched DNA was cloned with DH5- $\alpha$  competent cells using the pGEM-T Easy kit (Promega). A total of 144 positive clones were sequenced on a MegaBACE 1000 automated sequencer (GE Healthcare) using the DYEnamic Terminator kit (GE Healthcare).

The CID (Freitas et al., 2008) and Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc., Hastings, NY, USA) programs were used to search for microsatellite sequences and design primers. Polymerase chain reactions (PCRs) were performed using 250  $\mu$ M of each dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0  $\mu$ M of each primer, 1  $\times$  BioTools buffer and 1 U of *Taq* DNA polymerase (BioTools, Madrid, Spain) in a final volume of 10  $\mu$ L. Amplification was performed in an Eppendorf Mastercycler thermocycler for 30 cycles with an initial denaturation step at 94°C, followed by 30 s at 94°C, 20 s at the locus-specific annealing temperature (Table 1), one min at 72°C (elongation) and with a final extension for 10 min.

### RESULTS AND DISCUSSION

In total, seventeen primer pairs were designed and characterized. Of these, nine showed positive amplification, the forward

TABLE 1. Characterization of nine microsatellite loci in *T. albitarse*. F – the forward primer sequences; R – the reverse primer sequences; Ta – annealing temperature; Na – observed number of alleles; Ho – observed heterozygosity; He – expected heterozygosity; HWeq – Hardy-Weinberg Equilibrium.

Locus	Primer Sequence (5'–3')	Repeat motif	Range						GenBank accession no.
			Ta	(bp)	Na	Ho	He	HWeq	
Talb01	F: CTAGCCTCAGGCGAATTC R: GATTTCGAGTCTTGGTGCTAA	(TC) <sub>5</sub> TT (CT) <sub>3</sub>	58	124–132	3	0.135	0.177	0.031	JX437159
Talb02	F: GTCAGCAAACCTGGTCATCC R: CGTAAACTGGTCACTGGTG	(AG) <sub>3</sub> AA (AG) <sub>7</sub>	58	227–249	7	0.513	0.554	0.008	JX437160
Talb03	F: CTCCCAGAGCTGCAGTGT R: TACGAGACGGAAACAGAATG	(GA) <sub>5</sub>	58	197–207	5	0.567	0.664	0.414	JX437161
Talb05	F: GCAACTGAGAGATCGCTTC R: GTCTGTCTCAGCGAATAGTCAAG	(AG) <sub>4</sub> AA (AG) <sub>5</sub>	52	161–175	11	0.864	0.840	0.119	JX437162
Talb06	F: GCACCGATATTATTAAGTCTCA R: TGGAAAGAAGTATACATGTTCG	(AG) <sub>9</sub>	52	268–282	6	0.648	0.709	0.082	JX437163
Talb07	F: TCGCTGCCGACAATTATC R: GCAGTATTGAATCGGGTAAG	(TC) <sub>14</sub>	52	196–226	10	0.891	0.865	0.332	JX437164
Talb09*	F: GGCCAGAAGCGTAAGTAGA R: TGAGTGTATGTATTCGGCG	(GCT) <sub>5</sub>	58	359	1	–	–	–	JX437165
Talb12	F: AGGCTGGGCGTAGATTTTC R: TCGTATAACCTGTAGATAATGCC	(TC) <sub>3</sub> C (TCG) <sub>6</sub>	58	211	1	–	–	–	JX437166
Talb14	F: ACGAACACTGAGGTCCATAC R: GCATTCAAATTAGGCATCTC	(TG) <sub>5</sub>	48	245–249	3	0.323	0.285	1	KC135872

\* This locus was polymorphic for another *T. albitarse* population, presenting up to three alleles.

primers of which were end-labeled with fluorescence for genotyping using a MegaBace-1000 (GE) automated sequencer. Allele sizes were subsequently scored using the MegaBace Fragment Profiler program, version 1.2. The results of 37 genotyped females from different nests sampled in São Carlos (southeast Brazil; 22°01'S, 47°53'W) revealed seven polymorphic and two monomorphic loci (Table 1). The genotyping of five additional populations revealed Talb09 to be polymorphic, with up to three alleles in the case of a nest from Araras (southeast Brazil, 22°21'S, 47°23'W). The Genepop 4.0.10 (Raymond & Rousset; 1995; Rousset, 2008) and Arlequin 3.11 (Excoffier et al., 2005) programs were used to estimate allelic diversity, heterozygosity, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD) for the 37 females sampled in the São Carlos region. The number of alleles ranged from three to 11. Observed and expected heterozygosity on the population level ranged from 0.135 to 0.891 and 0.177 to 0.865, respectively (Table 1). No null alleles were found, as amplification occurred for all 146 males analyzed from 22 nests. Furthermore,

the sequential Bonferroni test (Rice, 1989) revealed no deviations from HWE or LD.

These markers were also found to be useful in cross amplifying DNA from other *Trypoxylon* species and the related sphecid genera *Podium* and *Sceliphron* using three to five specimens of each species (Table 2). All but one locus exhibited high rates of transferability, with positive amplification in most species (Table 2), but due to the low number of individuals analyzed, we have no information about allelic variation on these other species. Previous reports highlight the importance of publication of monomorphic loci for the target species; they have shown that such loci may actually be polymorphic when tested in other closely related species (e.g. Vecchia et al., 2011).

With the polymorphic loci found, an assignment test was performed using the GenAlex 6.4v program (Peakall & Smouse 2006), with 291 individuals representing 22 nests (considered here as families) of *T. albitarse*. A total of 88% of the specimens were assigned to their original families, demonstrating the effectiveness of these loci in relatedness studies.

TABLE 2. Results of cross-species amplification using microsatellite primers designed for *T. albitarse* in nine related species of wasps.

Locus	<i>Trypoxylon lactitarse</i>	<i>Trypoxylon rogenhoferi</i>	<i>Trypoxylon aurifrons</i>	<i>Trypoxylon nitidum</i>	<i>Trypoxylon agamemnon</i>	<i>Trypoxylon opacum</i>	<i>Trypoxylon asuncicola</i>	<i>Podium denticulatum</i>	<i>Sceliphron caementarium</i>
Talb01	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Talb02	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Talb03	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Talb05	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Talb06	+	+	+	+	+	+	–	–	–
Talb07	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Talb09	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Talb12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Talb14	–	+	+	+	+	–	–	–	–

The microsatellite loci described in the current study are the first for *T. albitorse*, and in fact, unique for any member of the genus *Trypoxylon*. Once *Trypargilum* males display the unusual guard behaviour, the developed microsatellite markers as here described may well prove useful in kinship studies, thereby providing insights into the mating system of these wasps. Cross-species positive amplification results revealed that these markers can also be useful in genetic studies of closely related wasp species. Lastly, we suspect that the polymorphic loci as described may also prove useful for future studies on the gene diversity, gene flow and genetic structure of natural populations of *Trypoxylon* species, more especially in terms of phylogeography and perhaps for some rarer species, conservation ecology-genetics.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** The authors are grateful for the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-480706/2010) and H.D. Loxdale for his helpful comments on the manuscript.

## REFERENCES

- BROCKMANN H.J. 1992: Male behavior, courtship and nesting in *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (Hymenoptera: Sphecidae). — *J. Kans. Entomol. Soc.* **65**: 66–84.
- COVILLE R.E. 1982: *Wasps of the Genus Trypoxylon subgenus Trypargilum in the North America*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 147 pp.
- COVILLE R.E. & COVILLE P.L. 1980: Nesting biology and male behaviour of *Trypoxylon (Trypargilum) tenocitlan* in Costa Rica (Hymenoptera: Sphecidae). — *Ann. Entomol. Soc. Am.* **73**: 110–119.
- EXCOFFIER L., LAVAL G. & SCHNEIDER S. 2005: Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. — *Evol. Bioinform. Online* **1**: 47–50.
- FERNANDES-SALOMÃO T.M., ROCHA R.B., CAMPOS L.A.O. & ARAÚJO E.E. 2005: The first internal transcribed spacer (ITS-1) from *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. — *Insectes Soc.* **52**: 11–18.
- FREITAS P.D., MARTINS D.S. & GALLETTI P.M. JR 2008: CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. — *Mol. Ecol. Resour.* **8**: 107–108.
- HAMILTON M.B., PINCUS E.L., DI FIORI A. & FLESHER R.C. 1999: Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. — *Bio-techniques* **27**: 500–507.
- HUGHES C. 1998: Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: A revolution results. — *Ecology* **79**: 383–399.
- KALTENPOTH M., STROHM E. & GADAU J. 2004: Polymorphic microsatellite markers for a solitary digger wasp, the European beewolf (*Philanthus triangulum*; Hymenoptera, Sphecidae). — *Mol. Ecol. Notes* **4**: 589–592.
- LUCAS E.R., HORSBURGH G.J., DAWSON D.A. & FIELD J. 2009: Characterization of microsatellite loci isolated from the wasp, *Microstigmus nigrophthalmus* (Hymenoptera). — *Mol. Ecol. Resour.* **9**: 1492–1497.
- PEAKALL R. & SMOUSE P.E. 2006: GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. — *Mol. Ecol. Notes* **6**: 288–295.
- QUELLER D.C., STRASSMANN J.E. & HUGHES C.R. 1993: Microsatellites and kinship. — *Trends Ecol. Evol.* **8**: 285–288.
- RAYMOND M. & ROUSSET F. 1995: GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. — *J. Hered.* **86**: 248–249.
- RICE W.R. 1989: Analyzing tables of statistical tests. — *Evolution* **43**: 223–225.
- ROUSSET F. 2008: Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. — *Mol. Ecol. Resour.* **8**: 103–106.
- VECCHIA A.C.D., BIONDO D., SANCHES A., KEUROGHILIAN A., MIYAKI C.A., GALETTI M. & GALETTI P.M. JR 2011: Isolation and characterization of microsatellite loci for white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and cross-amplification in collared peccaries (*Pecari tajacu*). — *Conserv. Genet. Resour.* **3**: 151–154.

Received December 4, 2012; revised and accepted December 20, 2012

**ANEXO II.** Análise comparativa da segregação mendeliana dos alelos de locos microssatélites da prole de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* no ninho SC13, exemplificando um caso de estrutura genética intranidal simples com uma mãe e um pai (monoginia-monoandria). Subsequente tabelamento par a par da significância de *P* obtida no programa Kingroup 2 (Konovalov *et al* 2004).

Amostra	Sexo	Tubo	Célula	Talb01	Talb01	Talb02	Talb02	Talb03	Talb03	Talb05	Talb05	Talb06	Talb06	Talb07	Talb07	Talb09	Talb09	Talb14	Talb14
10916	F	A	3	128	128	233	235	201	201	168	167	268	268	208	199	359	359	245	245
11875	F	A	4	128	128	233	235	203	201	168	167	268	268	199	199	359	359	245	245
11876	F	A	5	128	128	233	235	203	201	168	167	268	268	208	199	359	359	245	245
11877	M	A	6	128		235		201		168		268		199		359		245	
11878	F	A	7	128	128	233	235	201	201	168	167	268	268	199	199	359	359	245	245
11879	F	A	8	128	128	233	235	201	201	171	167	278	268	208	199	359	359	245	245
11880	M	A	9	128		235		201		168		278		199		359		245	
10924	F	A	10	128	128	233	235	203	201	168	167	268	268	208	199	359	359	245	245
11881	M	A	13	128		235		203		168		268		199		359		245	
11882	M	A	14	128		235		201		168		278		208		359		245	

Representados em rosa os alelos herdados da mãe e em azul os do pai.

Amostra	10916	11875	11876	11877	11878	11879	11880	11924	11881	11882
10916	-									
11875	***	-								
11876	***	***	-							
11877	***	***	**	-						
11878	***	***	***	***	-					
11879	***	***	***	**	***	-				
11880	**	**	*	***	**	**	-			
11924	***	***	**	***	***	**	***	-		
11881	**	***	**	***	***	**	**	**	-	
11882	***	**	**	**	**	**	**	**	**	-

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$

**ANEXO III.** Análise comparativa da segregação mendeliana dos alelos de locos microssatélites da prole de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* no ninho SC 153, exemplificando um caso de troca sequencial de macho guarda (a prole dos tubos A e B tem pai diferente da dos tubos C e E). Subsequente tabelamento par a par da significância de *P* obtida no programa Kingroup 2 (Konovalov *et al* 2004).

Amostra	Sexo	Tubo	Célula	Talb01	Talb01	Talb02	Talb02	Talb03	Talb03	Talb05	Talb05	Talb06	Talb06	Talb07	Talb07	Talb09	Talb09	Talb14	Talb14
11638	M	A	1	128		242		203		171		280		203		359		245	
11600	F	A	2	128	128	235	235	203	199	171	173	280	278	208	216	-	-	245	245
11601	M	A	3	128		235		201		175		278		208		359		245	
11705	M	B	1	128		242		203		171		278		208		359		245	
11602	M	B	2	128		242		201		171		278		208		359		245	
11200	F	B	3	128	128	242	235	201	199	175	173	280	278	208	216	-	-	-	-
11598	M	B	4	128		242		201		175		280		208		359		245	
11706	F	C	2	128	128	242	235	201	205	175	171	280	278	203	199	359	359	245	245
11599	F	C	3	128	128	235	235	201	205	171	171	278	278	208	199	-	-	245	245
11707	F	C	4	128	128	242	235	201	205	175	171	280	278	203	199	-	-	245	245
11708	F	D	1	124	128	235	235	201	205	171	171	280	278	203	199	-	-	245	245
11709	F	D	2	124	128	242	235	201	205	175	171	278	278	203	199	359	359	245	245
11710	M	D	3	128		235		201		175		278		203		359		245	
11711	M	D	4	128		235		201		175		280		208		359		245	
11712	M	D	5	128		235		201		171		280		203		359		245	
11713	M	D	6	128		242		201		175		280		203		359		245	
11198	F	E	1	124	128	235	235	201	205	171	171	278	278	203	199	359	359	245	245
11714	M	E	2	128		235		201		175		280		208		359		245	

- missing data; representados em rosa alelos herdados da mãe, em azul os do pai 1, em vermelho os do pai 2 e em preto os alelos em comum entre os dois pais.

Amostra	11638	11600	11601	11705	11602	11200	11598	11706	11599	11707	11708	11709	11710	11711	11712	11713	11198	11714
11638	-																	
11600	**	-																
11601	*	**	-															
11705	**	**	**	-														
11602	**	**	**	***	-													
11200	*	***	***	**	**	-												
11598	**	**	**	**	**	***	-	**										
11706	**	ns	**	**	*	ns	**	-										
11599	*	ns	**	***	**	ns	**	***	-									
11707	**	ns	**	**	*	ns	**	***	***	-								
11708	**	ns	*	**	**	ns	**	***	***	***	-							
11709	**	ns	**	**	*	ns	*	***	**	***	***	-						
11710	*	*	**	*	*	**	**	**	**	**	*	**	-					
11711	*	**	***	**	**	***	**	**	**	**	*	*	**	-				
11712	**	**	*	*	*	*	**	**	**	**	**	***	**	**	-			
11713	**	*	**	*	*	**	***	***	**	**	**	**	**	**	**	-		
11198	**	ns	*	*	*	ns	*	***	***	***	***	***	*	**	***	*	-	
11714	*	**	***	**	**	***	***	**	**	**	*	*	**	***	**	**	*	-

ns=não significativo, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$

**ANEXO IV.** Análise comparativa da segregação mendeliana dos alelos de locos microssatélites da prole de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* no ninho SC 33, exemplificando dois casos de cópula extrapar (amostras 11901 e 11899). Subsequente tabelamento par a par da significância de *P* obtida no programa Kingroup 2 (Konovalov *et al* 2004).

Amostra	Sexo	Tubo	Célula	Talb01	Talb01	Talb02	Talb02	Talb03	Talb03	Talb05	Talb05	Talb06	Talb06	Talb07	Talb07	Talb09	Talb09	Talb14	Talb14
11900	M	A	2	128		235		201		171		278		201		-		245	
10913	F	B	1	128	128	235	235	199	199	173	173	278	278	199	201	359	359	245	245
11901*	F	B	2	128	128	235	235	201	203	171	171	278	278	199	203	359	359	245	245
11902	M	B	3	128		235		201		171		278		201		359		245	
10903	M	B	4	128		235		199		173		278		201		359		245	
11904	M	C	1	128		235		199		171		278		201		359		245	
10862	F	C	2	128	128	235	235	199	199	171	173	278	278	199	201	359	359	245	245
11899*	F	C	3	128	128	235	235	199	203	173	171	278	278	199	203	359	359	245	245
11905	F	D	4	128	128	235	235	201	199	173	173	278	278	199	201	359	359	245	245

- missing data; \* filhas provenientes de cópula extrapar; representados em rosa os alelos herdados da mãe, em azul os alelos do pai 1, em vermelho os alelos do pai 2 e em preto os alelos compartilhados pelos dois pais.

Amostra	11900	11913	11901	11902	11903	11904	11862	11899	11905
11900	-								
11913	**	-							
11901	**	ns	-						
11902	***	**	**	-					
11903	**	***	*	**	-				
11904	**	**	**	**	**	-			
11862	**	**	ns	**	***	***	-		
11899	**	ns	***	**	***	**	ns	-	
11905	**	***	ns	**	***	**	**	ns	-

ns=não significativo, \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$

**ANEXO V.** Análise comparativa da segregação mendeliana dos alelos de locos microssatélites da prole de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* no ninho SC 157, exemplificando um caso de troca sequencial de fêmea construtora (a prole do tubo A tem mãe diferente da dos tubos B e C). Subsequente tabelamento par a par da significância de *P* obtida no programa Kingroup 2 (Konovalov *et al* 2004).

Amostra	Sexo	Tubo	Célula	Talb01	Talb01	Talb02	Talb02	Talb03	Talb03	Talb05	Talb05	Talb06	Talb06	Talb07	Talb07	Talb09	Talb09	Talb14	Talb14
11715	M	A	1	128		242		199		173		278		208		359		245	
11716	F	A	2	128	128	242	235	199	199	167	173	278	278	194	198	-	-	245	245
11717	F	A	4	128	128	242	235	205	199	173	173	278	278	208	198	359	359	245	245
11196	F	A	5	128	128	242	235	205	199	173	173	278	278	208	198	359	359	245	245
11623	F	B	2	128	128	242	235	203	199	171	173	278	278	208	198	359	359	249	245
11624	M	B	3	128		242		203		171		278		198		359		249	
11718	M	C	1	128		242		203		175		278		208		359		247	
11719	M	C	3	124		235		205		175		282		198		359		247	
11720	F	C	4	128	128	235	235	205	199	175	173	282	278	198	198	359	359	247	245

- *missing data*, representado em azul os alelos herdados do pai, em rosa os alelos da mãe 1, em verde os alelos da mãe 2 e em preto alelos compartilhados pelas duas mães.

Amostra	11715	11716	11717	11196	11623	11624	11718	11719	11720
11715	-								
11716	*	-							
11717	***	ns	-						
11196	***	ns	***	-					
11623	**	ns	***	***	-				
11624	*	ns	**	**	***	-			
11718	**	ns	**	**	**	**	-		
11719	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	-	
11720	*	ns	**	**	*	**	**	***	-

ns=não significativo, \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$

**ANEXO VI.** Análise comparativa da segregação mendeliana dos alelos de locos microssatélites da prole de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* no ninho SC 166, incluindo os genótipos da fêmea nidificadora e do macho guarda, onde possivelmente houve troca sequencial de mãe a partir do tubo C e a amostra 12131 sugere usurpação de ninho por uma fêmea intrusa. Subsequente tabelamento par a par da significância de *P* obtida no programa Kingroup 2 (Konovalov *et al* 2004).

Amostra	Sexo	Tubo	Célula	Talb01	Talb01	Talb02	Talb02	Talb03	Talb03	Talb05	Talb05	Talb06	Talb06	Talb07	Talb07	Talb09	Talb09	Talb14	Talb14
12138	M	A	1	128		235		199		173		278		201		359		245	
12127	M	A	2	128		235		199		168		268		201		359		245	
12128	F	A	3	128	128	235	235	199	201	173	170	268	280	198	203	359	359	245	245
12129	F	B	2	128	128	235	235	199	201	173	170	278	280	201	203	359	359	245	245
12130	F	C	1	128	128	235	235	203	201	168	170	278	280	212	203	-	-	245	245
12131*	F	C	2	128	128	242	235	199	203	167	173	278	278	223	203	-	-	245	245
12132	F	C	3	128	128	242	235	203	201	164	170	282	280	212	203	-	-	245	245
12133	F	C	4	128	128	235	235	203	201	168	170	282	280	216	203	359	359	245	245
12139	M	C	5	128		235		201		164		278		216		-		-	
12140	F	D	2	128	128	235	235	203	201	164	170	282	280	216	203	-	-	-	-
12141	F	D	3	128	128	235	235	203	201	168	170	278	280	212	203	-	-	-	-
12142	M	D	4	128		242		201		164		278		216		-		245	
12135	M	E	1	128		235		-		164		-		212		-		-	
12136	F	Fêmea		128	128	242	235	203	201	164	168	278	282	212	216	359	359	245	245
12137	M	M. guarda		128		235		201		170		280		203		359		245	

- *missing data*; \* filha de uma fêmea usurpadora fecundada por outro macho; em verde representados os alelos herdados da mãe 1, em rosa os alelos da mãe 2, em roxo os alelos da mãe 3 (fêmea usurpadora), em vermelho os alelos do macho que fecundou a mãe 3 (fêmea usurpadora), em azul os alelos herdados do macho guarda e em preto alelos em comum entre as mães e os pais.

Amostra	12138	12127	12128	12129	12130	12131	12132	12133	12139	12140	12141	12142	12135	12136	12137
12138	-														
12127		-													
12128	**	**	-												
12129	*	**	***	-											
12130	*	*	ns	ns	-										
12131	**	**	ns	ns	ns	-									
12132	*	*	ns	ns	***	ns	-								
12133	**	*	ns	ns	***	ns		-							
12139	*	*	*	*	**	*	***	***	-						
12140	*	*	ns	ns	***	ns	***	***	***	-					
12141	*	**	ns	ns	***	ns	***	***	**	***	-				
12142	*	*	*	*	*	*	**	*	***	***	*	-			
12135	*	*	*	**	**	*	***	*	***	***	**	**	-		
12136	*	**	ns	ns	***	ns	***	***	***	***	**	***	***	-	
12137	*	*	***	***	***	*	***	***	*	**	***	*	*	*	-

ns=não significativo, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$