

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução**

**“Biologia de Nidificação e Estrutura Sociogenética  
Intranidal em Espécies de *Trypoxylon* (Hymenoptera:  
Crabronidae)”**

**Mariana Marchi Santoni**

**SÃO CARLOS, SP**  
**2008**

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução**

**“Biologia de Nidificação e Estrutura Sociogenética  
Intranidal em Espécies de *Trypoxylon* (Hymenoptera:  
Crabronidae)”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Evolução do Centro de  
Ciências Biológicas e da Saúde da  
Universidade Federal de São Carlos,  
como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Evolução, área de  
concentração: Genética e Evolução.

Orientador: Marco Antonio Del Lama

**SÃO CARLOS, SP**

**Março – 2008**

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

S237bn

Santoni, Mariana Marchi.

Biologia de nidificação e estrutura sociogenética intranidal em espécies de *Trypoxylon* (Hymenoptera:Crabronidae) / Mariana Marchi Santoni. -- São Carlos : UFSCar, 2008. 152 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Crabronidae. 2. Sazonalidade. 3 Habitat (Ecologia). 4. Alocação sexual. 5. Parentesco. 6. Alozimas. I. Título.

CDD: 595.798 (20<sup>a</sup>)

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

**BIOLOGIA DE NIDIFICAÇÃO E ESTRUTURA SOCIOGENÉTICA  
INTRANIDAL EM ESPÉCIES DE *Trypoxylon* (HYMENOPTERA:  
CRABONIDAE)**

Dissertação de Mestrado de Mariana Marchi Santoni

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Profa. Dra. Maria José de Oliveira Campos

Profa. Dra. Maria Luisa Tunes Buschini

.....  
.....  
.....

“Onde estiver o teu tesouro, ali estará também o teu coração”

(Lucas 12, 34)

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

(Fernando Pessoa)

Dedico este trabalho aos meus pais, familiares e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo que me tem oferecido.

A todas as pessoas que, de alguma forma, participaram fundamentalmente para a realização deste trabalho. Pessoas que tornaram estes anos convívio, momentos inesquecíveis.

Aos meus pais, Edson e Maria do Carmo, as pessoas mais importantes na minha vida, agradeço por todo o amor e dedicação. Por todo o trabalho e preocupação que me oferecem sem medidas. Obrigada por terem me ajudado a ser quem eu sou e a me ensinado a crescer em meus sonhos. Agradeço também a todos os meus familiares, avós e primos, que sempre me apoiaram e ensinaram muito.

A José Eduardo, pelo seu amor, carinho, amizade e compreensão, que me oferece sempre de braços abertos, de uma forma muito generosa. Agradeço a você por fazer parte de minha vida e por compartilhar sua vida comigo. Obrigada por oferecer sua “veia artística”, me presenteando com a maravilhosa arte gráfica em meus pôsteres e capas de trabalho!

Ao professor Marco, pela oportunidade de convívio durante estes anos, por me receber de portas abertas em seu laboratório, confiando-me a realização deste trabalho. Foi uma honra ter sido sua aluna. Agradeço pela ajuda, incentivo, paciência, orientação e amizade. Obrigada por me ensinar a “voar”.

Às amigas da graduação, Inessa, Nathalia e Livia, pela grande amizade, carinho e compreensão. Mesmo distantes, a certeza de uma amizade sincera é percebida diariamente.

Agradeço a Thaís, Rogério, Otávio, Natália, Regina e Juliano por fazerem parte de minha vida e me ajudarem a crescer como pessoa e como profissional, sendo exemplos, conselheiros e ouvintes. Muito obrigada pela amizade e pelos almoços sempre tão divertidos!

À Isabel, por sua amizade, carinho, paciência e dedicação. Obrigada pelo convívio e pela ajuda, amiga e profissional, nas análises alozímicas.

Aos (muitos) coletas de laboratório, Amanda, Bruno, Camilla, Cíntia, Kátia, Keize, Luci, Margarita e Vanessa, pessoas que se revelaram muito amigas e prestativas, fazendo com que o ambiente de trabalho fosse harmonioso e agradável. Agradeço pela ajuda e convívio. Agradeço também aos colegas de departamento, em especial Samantha, Vanessa e Patrícia. Pessoas que tornam o ambiente de trabalho mais amigável.

À professora Silvia, por alguns anos de convivência e pela calma, paciência e perseverança que transmite. Aos alunos do Laboratório de Genética de Aves, Juliana, Luiza, Iara, Carolina, Thaís, Mateus e Rafael. Por compartilharem suas experiências.

À professora Maria Cristina Arias, por me receber em seu laboratório no Instituto de Biociências da USP-SP e por toda ajuda durante minha estada. Agradeço também a todo o pessoal de seu laboratório, Suzy, Alayne, Alyson, Paulo Henrique e Elaine, que muito me ensinaram de técnicas laboratoriais, além de me receberem de uma forma muito amigável.

Agradeço às pessoas que convivi por algum tempo em São Paulo, e em especial, àquelas que muito me ensinaram, como a Nice e o Renato.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação de Genética e Evolução da UFSCar, pelo profissionalismo, dedicação e ajuda na carreira profissional dos alunos que ingressam neste programa.

Ao Dr. Sérgio Túlio Pires Amarante (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo) e ao Técnico José Carlos Serrano (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP) pela identificação das vespas. Ao Dr. Antonio Brescovit, do Instituto Butantã, pela identificação das aranhas.

A Dr. Adhemar Rodrigues Alves, dono da Fazenda Rio Branco (Rifaina – SP).  
À Dra. Maria José de Oliveira Campos pela leitura de manuscrito e sugestões.

À Fapesp, pela bolsa de estudos a mim conferida para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Aspectos da ordem Hymenoptera.....	1
1.2. Vespas Eufecídeas .....	3
1.3. Aspectos do gênero <i>Trypoxylon</i> .....	4
1.5. Justificativa .....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
3.1. Espécies estudadas .....	8
3.2. Local de estudo .....	12
3.3. Método de amostragem .....	14
3.4. Dados analisados .....	16
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1. Ocupação Diferencial do Habitat por vespas do gênero <i>Trypoxylon</i> (<i>Trypargilum</i>) (Hymenoptera: Crabronidae)</b> .....	<b>19</b>
4.1.1 Introdução .....	22
4.1.2 Material e Métodos .....	23
4.1.3 Resultados .....	26
4.1.4 Discussão .....	27
<b>4.2. Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp <i>Trypoxylon</i> (<i>Trypargilum</i>) <i>aurifrons</i> Shuckard (Hymenoptera: Crabronidae)</b> .....	<b>38</b>
4.2.1 Introduction .....	41
4.2.2 Material and Methods .....	42
4.2.3 Results .....	44
4.2.4 Discussion .....	47

<b>4.3. Estrutura do pupário de duas espécies de <i>Trypoxylon (Trypargilum)</i> (Hymenoptera: Crabronidae)</b> .....	<b>57</b>
4.3.1 Introdução .....	57
4.3.2 Material e Métodos .....	58
4.3.3 Resultados .....	59
4.3.4 Discussão .....	62
<b>4.4. Alocação sexual sazonal em espécies de <i>Trypoxylon</i> Latreille (Hymenoptera: Crabronidae)</b> .....	<b>67</b>
4.4.1 Introdução .....	67
4.4.2 Material e Métodos .....	68
4.4.3 Resultados .....	71
4.4.4 Discussão .....	73
<b>4.5. Caracterização Alozímica, Estrutura Genética Populacional e Intranidal de Vespas do Gênero <i>Trypoxylon</i> (Hymenoptera: Crabronidae)</b> .....	<b>95</b>
4.5.1 Introdução .....	95
4.5.2 Material e Métodos .....	96
4.5.3 Resultados .....	99
4.5.4 Discussão .....	102
<b>4.6. Caracterização do DNA mitocondrial de <i>Trypoxylon (Trypargilum) nitidum</i> (Hymenoptera: Crabronidae)</b> .....	<b>126</b>
4.5.1 Introdução .....	126
4.5.2 Material e Métodos .....	127
4.5.3 Resultados .....	130
4.5.4 Discussão .....	135
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>136</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>139</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Locais de disposição de ninhos-armadilha em Araras, SP.....	12
<b>Tabela II.</b> Locais de disposição de ninhos-armadilha em São Carlos, SP.....	13
<b>Tabela III.</b> Locais de disposição de ninhos-armadilha na Fazenda Rio Branco, Rifaina, SP.....	14

### Ocupação Diferencial do Habitat por vespas do gênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera: Crabronidae)

<b>Tabela I.</b> Número de ninhos de espécies de <i>Trypoxylon</i> coletados em três localidades do estado de São Paulo.....	32
<b>Tabela II.</b> Correlação (r) entre o número de ninhos das espécies de <i>Trypoxylon</i> e a temperatura média diária ou a precipitação total referentes às coletas realizadas em Araras – SP.....	32
<b>Tabela III.</b> Comprimento (cm) e diâmetro (mm) dos ninhos-armadilha utilizados pelas espécies de <i>Trypoxylon</i> . Teste de Mann-Whitney (U); * P>0.05. Letras iguais indicam médias semelhantes.....	32
<b>Tabela IV.</b> Arquitetura dos ninhos fundados por espécies de <i>Trypoxylon</i> em ninhos-armadilha em três localidades do estado de São Paulo (A = amplitude de variação; N = número de observações).....	33
<b>Tabela V.</b> Número de aranhas amostradas em ninhos fundados por espécies de <i>Trypoxylon</i> em três localidades do interior de São Paulo: a = Araras, r = Rifaina e s = São Carlos.....	34
<b>Tabela IV.</b> Número de células, taxas de emergência e mortalidade em espécies de <i>Trypoxylon</i> de três localidades do Estado de São Paulo. o = ovo, l = larva, p = pupa.....	35

### Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aurifrons* Shuckard (Hymenoptera: Crabronidae)

<b>Table I.</b> Architecture of <i>Trypoxylon aurifrons</i> nests in trap-nests sampled in three localities of the state of São Paulo (N = number of observations).....	53
<b>Table II.</b> Dimensions of male and female cocoons (mm), weight-at-emergence (WE) (mg) and forewing length (FWL) (mm) in <i>Trypoxylon aurifrons</i> (N = number of observations).....	53
<b>Table III.</b> Normality test (F) for male and female weight values and ANOVA test for weight variance between nestmates and between individuals from different nests in Araras and Rifaina - SP.....	54
<b>Table IV.</b> Percentage of emerged <i>Trypoxylon aurifrons</i> males in each cell* according to their position in the nests (- no emergences).....	54
<b>Table V.</b> Number of cells, emerged and dead <i>Trypoxylon aurifrons</i> individuals collected in three areas of the state of São Paulo.....	54

**Estrutura do pupário de duas espécies de *Trypoxylon (Trypargilum)* (Hymenoptera:  
Crabronidae)**

<b>Tabela I.</b> Proporção de pupários “ND” (não dilatado) e “D” (dilatado) e razão sexual em amostras de <i>Trypoxylon rogenhoferi</i> e <i>Trypoxylon lactitarse</i> em três regiões do estado de São Paulo. ....	61
<b>Tabela II.</b> Número de ninhos apresentando o tipo de pupário de cada progênie: pupário não dilatado (ND); pupário dilatado (D) .....	62
<b>Tabela III.</b> Tipo de pupário de cada progênie e provável genótipo parental para a característica de pupários: “ND”: pupário não dilatado o; “D”: pupário dilatado.....	65

**Alocação sexual sazonal em espécies de *Trypoxylon* Latreille (Hymenoptera:  
Crabronidae)**

<b>Tabela I.</b> Abundância sazonal e arquitetura de ninhos de espécies de <i>Trypoxylon</i> coletadas por ninhos-armadilha em duas áreas do estado de São Paulo. Os valores de correlação ( $r$ ) entre o número de células por ninho e o comprimento são apresentados. A: amplitude de variação; QU: estação quente-úmida; FS: fria-seca.....	81
<b>Tabela II.</b> Média $\pm$ erro padrão e dimorfismo sexual (DS) (dimorfismo sexual para tamanho de corpo foi expresso pela razão do valor médio de cada característica nas fêmeas sobre o valor médio do traço nos machos) de cinco caracteres morfológicos de machos e fêmeas de <i>Trypoxylon</i> . CAA – comprimento da asa anterior, LAA – largura da asa anterior, CAP – comprimento da asa posterior e LAP – largura da asa posterior. Valores de teste $t$ comparando as características de machos e fêmeas são apresentados .....	82
<b>Tabela III.</b> Coeficiente de variação de cinco caracteres medidos em machos e fêmeas de espécies de <i>Trypoxylon</i> : peso, comprimento da asa anterior (CAA), largura da asa anterior (LAA), comprimento da asa posterior (CAP) e largura da asa posterior (LAP). .....	83
<b>Tabela IV.</b> Correlação de Pearson entre os cinco caracteres analisados: Peso (mg), CAA (mm) – comprimento da asa anterior, LAA (mm) – largura da asa anterior, CAP (mm) – comprimento da asa posterior e LAP (mm) – largura da asa posterior em quatro espécies de <i>Trypoxylon</i> .....	83
<b>Tabela V.</b> Razão sexual (fêmeas : machos) em espécies de <i>Trypoxylon</i> coletadas em duas áreas do estado de São Paulo em diferentes épocas de coleta. Os valores de $\chi^2_1$ comparando a razão sexual observada (obs.) com a esperada de 1:1 são apresentados. QU: quente-úmida; FS: fria-seca.....	84
<b>Tabela VI.</b> Média $\pm$ erro padrão da fecundidade das fêmeas fundadoras (número de células por ninho) e pesos de machos e fêmeas de quatro espécies de <i>Trypoxylon</i> emergidos em laboratório. As espécies foram coletadas em duas áreas do estado de São Paulo em duas	

estações: (QU: quente-úmida; FS: fria-seca). Teste <i>t</i> comparando as características de indivíduos produzidos nas estações. ....	85
<b>Tabela VII.</b> Número de machos e fêmeas emergidos de cada célula de ninhos-armadilha de quatro espécies de <i>Trypoxylon</i> . As células são numeradas a partir da extremidade oposta à entrada do ninho. ....	86
<b>Tabela VIII.</b> Herdabilidade $\pm$ erro padrão para peso de machos e fêmeas de espécies de <i>Trypoxylon</i> . 86	
<b>Tabela IX.</b> Média $\pm$ erro padrão de pesos de machos e fêmeas de espécies de <i>Trypoxylon</i> emergidos em ninhos com diferentes números de células. Os valores de <i>F</i> (ANOVA) são apresentados.87	

### **Caracterização Alozímica, Estrutura Genética Populacional e Intranidal de Vespas do Gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae)**

<b>Tabela I.</b> Número de amostras e de ninhos utilizados em análises eletroforéticas de quatro espécies de <i>Trypoxylon</i> . ....	109
<b>Tabela II.</b> Soluções-tampão e condições eletroforéticas usadas para as análises alozímicas em espécies de <i>Trypoxylon</i> .....	109
<b>Tabela III.</b> Sistemas enzimáticos, classificação e abreviação de acordo com “Enzyme Commission” (EC) e as respectivas soluções-tampão utilizadas em cada sistema (Tabela II).....	110
<b>Tabela IV.</b> Número de locos enzimáticos analisados, grau de polimorfismo, número efetivo de alelos e heterozigosidade média para cada espécie de <i>Trypoxylon</i> coletada em três localidades do estado de São Paulo .....	110
<b>Tabela V.</b> Frequências alélicas observadas e testes de $\chi^2$ para verificação da hipótese nula de aderência ao Equilíbrio de HW (EHW) em espécies de <i>Trypoxylon</i> coletadas em três cidades do estado de São Paulo.....	111
<b>Tabela VI.</b> Frequências alélicas em locos enzimáticos de populações de <i>Trypoxylon</i> subdivididas por época de coleta, provenientes de três cidades do estado de São Paulo .....	112
<b>Tabela VII.</b> Heterozigosidade intra-loco observada e esperada e heterozigosidade média ( $\pm$ Erro padrão) em espécies de <i>Trypoxylon</i> coletadas em três cidades do estado de São Paulo durante três anos. *Valores significativos de $\chi^2$ .....	113
<b>Tabela VIII.</b> Valores de $F_{st}$ par-a-par para as subpopulações de <i>Trypoxylon aurifrons</i> e <i>Trypoxylon nitidum</i> analisadas para alozimas, provenientes de duas cidades do estado de São Paulo. As letras sobrescritas indicam a significância dos valores de $\chi^2$ .....	115
<b>Tabela IX.</b> Parentesco médio entre as fêmeas de <i>Trypoxylon</i> que emergiram de mesmo ninho, coletadas em duas cidades do estado de São Paulo. N = número de fêmeas analisadas por ninho; R ( $\pm$ EP) = grau de parentesco médio e erro-padrão (Jackknife sobre ninhos); IC 95% = intervalo de confiança.....	115

- Tabela X.** Ninhos cujos fenótipos aloenzimáticos indicam acasalamentos extra-par de fêmeas das espécies de *Trypoxylon* amostradas em duas regiões do estado de São Paulo. Os possíveis fenótipos parentais estão também apresentados.....117
- Tabela XI.** Ninhos em que os fenótipos aloenzimáticos observados indicam associação de fêmeas e/ou usurpação de ninhos das espécies de *Trypoxylon* amostradas em Araras – SP. ....122

**Caracterização do DNA mitocondrial de *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum*  
(Hymenoptera: Crabronidae)**

- Tabela I.** Pares de *primers* testados para a amplificação do genoma mitocondrial via PCR de *Trypoxylon nitidum*, suas localizações (genes onde se ancoram), seqüências e referências bibliográficas. ....128
- Tabela II.** Tamanho dos fragmentos esperado para *Apis mellifera* e observado em *Trypoxylon nitidum* obtidos pela utilização dos pares de *primers*. O código segue na Tabela I .....131

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Filogenia consenso das famílias de Aculeata (Brothers 1999), obtida a partir da análise de caracteres morfológicos.....	3
<b>Figura 2.</b> Nidificação de <i>Trypoxylon rogenhoferi</i> em ninhos-armadilha. a) fêmea chegando ao ninho; b) macho-guarda. Fotos obtidas em 10/10/04, em Araras.....	5
<b>Figura 3.</b> a) Fêmea de <i>Trypoxylon rogenhoferi</i> com uma porção de barro para nidificação em ninho-armadilha (foto obtida em 20/05/06, em Araras); b) fêmea de <i>Trypoxylon nitidum</i> construindo parede de fechamento com barro (foto obtida em 19/01/07, em São Carlos).....	8
<b>Figura 4.</b> <i>Trypoxylon rogenhoferi</i> : a) fêmea; b) clipeo de macho, com destaque para a estrutura de identificação; c) clipeo de fêmea, com destaque para a estrutura de identificação. Fotos obtidas em lupa LEICA IM 50 em 25/06/07.....	9
<b>Figura 5.</b> <i>Trypoxylon lactitarse</i> : a) fêmea; b) clipeo de macho, com destaque na estrutura de identificação; c) clipeo de fêmea, com destaque na estrutura de identificação. Fotos obtidas em lupa LEICA IM 50 em 25/06/07.....	10
<b>Figura 6.</b> <i>Trypoxylon aurifrons</i> : a) fêmea; b) frente de fêmea, com destaque para a estrutura de identificação – ocelos e frente. Fotos obtidas em lupa LEICA IM 50 em 25/06/07.....	11
<b>Figura 7.</b> <i>Trypoxylon nitidum</i> : a) fêmea; b) frente de fêmea, com destaque para a estrutura de identificação – ocelos e frente. Fotos obtidas em lupa LEICA IM 50 em 25/06/07.....	11
<b>Figura 8.</b> Locais de disposição de ninhos-armadilha no <i>campus</i> da Universidade Federal de São Carlos em Araras - SP.....	12
<b>Figura 9.</b> Locais de disposição de ninhos-armadilha no <i>campus</i> da Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos - SP.....	13
<b>Figura 10.</b> Locais de disposição de ninhos-armadilha na Fazenda Rio Branco, em Rifaina – SP.....	14
<b>Figura 11.</b> Ninho-armadilha construído a partir de bambu seco.....	15
<b>Figura 12.</b> Abundância de himenópteros que nidificaram em ninhos-armadilha em três localidades do interior de São Paulo. Spp “menores” e spp “maiores” indicam espécies de <i>Trypoxylon</i> pertencentes ao grupo <i>nitidum</i> e <i>punctulatum</i> , respectivamente, mas que não apresentaram emergência para permitir a identificação da espécie.....	16

**Ocupação Diferencial do Habitat por vespas do gênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*)  
(Hymenoptera: Crabronidae)**

- Figura 1.** Número de ninhos fundados por espécies de *Trypoxylon* em cada amostragem em três localidades do estado de São Paulo.....36
- Figura 2.** Ninhos fundados por espécies de *Trypoxylon* (em porcentagem) coletados em cada sítio (número nas barras) das três localidades do estado de São Paulo.....37

**Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aurifrons*  
Shuckard (Hymenoptera: Crabronidae)**

- Figure 1.** Climate conditions and number of *Trypoxylon aurifrons* nests and brood cells obtained monthly during three years of sampling in Araras (SP).....55
- Figure 2.** Lengths (a) and diameters (b) of the trap-nests used by *Trypoxylon aurifrons*. . . . .56
- Figure 3.** Proportion of males and females according to the inner diameter of the trap-nest.....56

**Estrutura do pupário de duas espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera:  
Crabronidae)**

- Figura 1.** Ninho de *Trypoxylon rogenhoferi*, apresentando os tipos de pupários: a) “ND”; b) “D”. ....60
- Figura 2.** Pupários de *Trypoxylon rogenhoferi*. a) pupário do tipo dilatado – as diferentes dimensões de diâmetro acompanham os diferentes diâmetros dos ninhos-armadilha utilizados; b) pupário do tipo não dilatado. ....60
- Figura 3.** Proporção de pupários tipo não dilatado (“ND”) e dilatado (“D”) em ninhos de a) *Trypoxylon rogenhoferi* e b) *Trypoxylon lactitarse* amostrados por meio de ninhos-armadilha de diversos diâmetros (mm) em três localidades do estado de São Paulo. As indicações nas barras indicam o número de observações. ....60
- Figura 4.** Regressão linear mostrando a influência do diâmetro dos ninhos-armadilha, utilizados em três localidades do interior de São Paulo, sobre o arcosseno da razão de pupários não dilatado sobre o total de células de ninhos de a) *Trypoxylon rogenhoferi* ( $y = 0.12x - 0.70$ ;  $F = 174,06$ ;  $gl = 406$ ;  $P = 0,00$ ) e b) *Trypoxylon lactitarse* ( $y = 0.13x - 0.53$ ;  $F = 38,11$ ;  $gl = 70$ ;  $P = 0,00$ ).....61

**Alocação sexual sazonal em espécies de *Trypoxylon* Latreille (Hymenoptera: Crabronidae)**

- Figura 1.** Asas direitas anterior (a) e posterior (b) de *Trypoxylon aurifrons* destacando os caracteres estudados. CAA: comprimento da asa anterior, LAA: largura da asa anterior, CAP: comprimento da asa posterior e LAP: largura da asa posterior. ....88
- Figura 2.** Proporção de machos e fêmeas de a) *Trypoxylon rogenhoferi*; b) *Trypoxylon lactitarse*; c) *Trypoxylon aurifrons*; d) *Trypoxylon nitidum* em cada classe de diâmetro do ninho (mm).. 88
- Figura 3.** Regressão linear do diâmetro e do número de células dos ninhos-armadilha sobre o arccosseno da porcentagem de machos de a) e b) *Trypoxylon rogenhoferi* ( $F = 1,87$ ;  $gl = 105$ ;  $P = 0,17$ ;  $F = 15,09$ ;  $GL = 105$ ;  $P = 0,00$ , respectivamente) e c) e d) *Trypoxylon aurifrons* ( $F = 0,93$ ;  $gl = 39$ ;  $P = 0,66$ ;  $F = 15,38$ ;  $GL = 22$ ;  $P = 0,00$ , respectivamente).. 89
- Figura 4.** Variação sazonal do peso (mg) de adultos de espécies de *Trypoxylon* coletados em Araras (a – d) e Rifaina (e – f). Os valores apresentados no gráfico correspondem às médias e o desvio padrão está representado pelas barras verticais de cada ponto. Os valores nas caixas representam o teste *t* comparando as massas de machos e fêmeas para cada estação. \*  $P < 0,05$ .. 92
- Figura 5.** Número de ninhos de: a) *Trypoxylon rogenhoferi*; b) *Trypoxylon lactitarse*; c) *Trypoxylon aurifrons* e d) *Trypoxylon nitidum* em cada classe de intervalo de tempo de acordo com a emergência do primeiro macho com a primeira fêmea de cada ninho.....93
- Figura 6.** Correlação entre os pesos médios de machos e fêmeas do mesmo ninho de a) *Trypoxylon rogenhoferi* ( $n = 156$  ninhos;  $P = 0,00$ ); b) *Trypoxylon lactitarse* ( $n = 20$  ninhos;  $P = 0,00$ ); c) *Trypoxylon aurifrons* ( $n = 38$  ninhos;  $P = 0,00$ ) e d) *Trypoxylon nitidum* ( $n = 38$  ninhos;  $P = 0,01$ ) .....94

**Caracterização Alozímica, Estrutura Genética Populacional e Intranidal de Vespas do Gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae)**

- Figura 1.** Padrão eletroforético de a) esterase, b) fosfoglicomutase, e c) isocitrato desidrogenase em extratos de *Trypoxylon aurifrons* obtido em gel de amido em tampão tris-citrato pH 7,5... 123
- Figura 2.** Padrão eletroforético de a) esterase, b) fosfoglicomutase e c) isocitrato desidrogenase em extratos de *Trypoxylon nitidum* obtido em gel de amido em tampão tris-citrato pH 7,5.....123
- Figura 3.** Padrão eletroforético de a) esterase, b) fosfoglicomutase e c) malato desidrogenase em extratos de *Trypoxylon lactitarse* obtido em gel de amido em tampão tris-citrato pH 8,0...124
- Figura 4.** Padrão eletroforético de a) esterase, b) isocitrato desidrogenase, c) malato desidrogenase, d) fosfoglicomutase-2, e) fosfoglicomutase-1 e f)  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase em extratos de *Trypoxylon rogenhoferi* obtido em gel de amido em tampão tris-citrato pH 7,5. ....125

**Caracterização do DNA mitocondrial de *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum*  
(Hymenoptera: Crabronidae)**

- Figura 1.** Representação do DNA mitocondrial de *Apis mellifera*. Fonte: <http://inapicoltura.org>.....126
- Figura 2.** Padrão de amplificação dos locos flanqueados pelos *primers*: a) Seq18 + 8467 F e mtD 26 + mtD 30; b) 16S R + mtD 36 e mtD 8 + mtD 12; A = água (controle negativo da PCR); M = marcadores ( $\phi$ X e  $\lambda$ -Hind) .....131
- Figura 3.** Mapa do mtDNA de *Apis mellifera* e localização dos *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse em *Trypoxylon nitidum* que apresentaram sucesso (entre parênteses está o tamanho de cada fragmento amplificado).. .....132
- Figura 4.** Análise da região 16S+12S seqüenciada de *Trypoxylon nitidum*: alinhamento das seqüências de nucleotídeos das espécies Ap (*Apis mellifera*) e Tn (*Trypoxylon nitidum*).....133
- Figura 5.** Análise da região Cyt B+ND1 seqüenciada de *Trypoxylon nitidum*: alinhamento das seqüências de nucleotídeos das espécies Ap (*Apis mellifera*) e Tn (*Trypoxylon nitidum*)....134

## RESUMO

Fêmeas de vespas do gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae) aprovacionam seus ninhos de forma massal com aranhas paralizadas. Algumas espécies constróem ninhos de barro, enquanto outras utilizam-se de cavidades pré-existentis, nas quais formam células separadas por paredes de barro. Os machos de algumas espécies do subgênero *Trypargilum* desempenham o papel de guarda do ninho, ajudando ainda na sua construção e forrageamento. Neste estudo, dados sobre a biologia da nidificação e estrutura genética intranidal foram obtidos e analisados comparativamente para quatro espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) – *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* –. As espécies foram amostradas por meio de ninhos-armadilha, confeccionados com bambu, durante três anos em Araras e dois anos em Rifaina e São Carlos (SP). As localidades de estudo foram subdivididas em sítios de amostragem. Os ninhos coletados foram levados ao laboratório e seus pupários foram individualmente armazenados em frascos de vidro. Os adultos emergidos foram identificados e a data de emergência, peso e sexo anotados. Posteriormente, foram armazenados à -20°C. Para as análises genéticas do estudo de parentesco intranidal, utilizou-se marcadores alozímicos revelados por eletroforese horizontal em gel de amido. Alguns adultos foram também submetidos a análises morfométricas de asa (comprimento e largura das asas anterior e posterior) e análises do DNA mitocondrial. Ao todo, foram obtidos 2.908 ninhos de himenópteros solitários, dos quais 2.478 fundados por espécies de *Trypoxylon*. Intensa atividade de nidificação e produção de células das quatro espécies foi observada principalmente na estação quente-chuvosa (outubro-março). Os tubos utilizados para nidificação pelas espécies apresentaram dimensões significativamente diferentes. A família de aranhas mais utilizada para aprovacionamento foi Araneidae, mas as espécies de vespas diferiram quanto às espécies forrageadas. O principal parasitóide das quatro espécies foi *Melittobia*. Observou-se que as espécies de *Trypoxylon* coexistem temporalmente e que nas três localidades cada espécie nidificou com maior frequência em um sítio particular, sugerindo ocupação diferencial do habitat em razão de “competição aparente”. A arquitetura intranidal das espécies estudadas não diferiu da relatada para outras espécies do subgênero *Trypargilum*: as fêmeas dividem o ninho-armadilha em seqüências de estoques de presas e terminam o ninho com a construção de uma parede de fechamento. Dois tipos de pupários foram observados em *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse*, como já descrito para outras espécies do grupo punctulatum. Esta característica mostrou-se associada ao sexo e ao diâmetro do ninho-armadilha e sua possível base genética é discutida. A razão sexual populacional 1:1 das quatro espécies foi constante durante todo o período de amostragem em Araras e Rifaina e a distribuição do sexo dentro do ninho não foi aleatória, sendo os machos frequentemente encontrados nas primeiras células de cria. As fêmeas foram significativamente maiores que os machos para os cinco caracteres de tamanho de corpo, sendo, portanto, observado um maior investimento parental para este sexo. Em média, o período de desenvolvimento destas espécies foi de 30 dias, sendo observada diapausa em *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse* na estação fria-seca. As análises alozímicas indicaram que, para a maioria dos ninhos estudados, os fenótipos sustentam a hipótese de monoginia/monandria, apoiando a idéia de que o comportamento do macho-guarda confere-lhe a paternidade da prole feminina. No entanto, acasalamentos extra-par e utilização de uma mesma cavidade por mais de uma fêmea foram verificados.

### ABSTRACT

Female wasps of the genus *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae) mass-provision their nests with paralyzed spiders. Some species build mud nests; others use preexisting tubular cavities that are divided into a linear series of cells separated by mud partitions. Males of the *Trypargilum* subgenus mate with the females at the time a nest is initiated and guard the nest until it is completed, helping the female in the building and provisioning activities. In this study, the biology of the nest building and nest genetic structure of four species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) – *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse*, *T. aurifrons* and *T. nitidum* – are shown. The species were sampled using trap-nests (made of dry bamboo stems) in three localities of the state of São Paulo: Araras (three years), São Carlos and Rifaina (two years). These areas were divided in sampling sites. The trap-nests used by the wasps were replaced with new ones and transported to the laboratory and they had the cocoons individually placed in vials. The emerged adults were identified and their emergency, weight and sex were registered. Later, they were stored at -20°C. Allozyme phenotypes determined through horizontal starch gel electrophoresis were used to the determination of the intranidal relatedness. Some adults were submitted to morphometric analysis of wing traits (length and width of the forewing and hindwing) and mitochondrial DNA analysis. It was collected 2,908 nests of solitary hymenopterans, and 2,478 were founded by *Trypoxylon* females. Nesting activity was higher in the warm-rainy season (October-March) in these species. The trap-nests used by the different species showed significantly different dimensions. Araneidae was the spider family mainly used for provision, but a species-specific provisioning was observed. The most important parasitoid of the four species was *Melittobia*. In the three areas, the different species of *Trypoxylon* coexist temporally but each of them built their nests frequently in a specific site. This result may suggest differential occupation of the habitat. The intranidal architecture of the studied species does not differ from other species of the *Trypargilum* subgenus: the females divide the nest-trap in sequences of provisioned cells and finish it with the construction of a closure plug. Two types of *T. rogenhoferi* and *T. lactitarse* cocoons were found, as observed for other species of the group punctulatum. It was verified that the frequencies of the two types are associated with sex and nest-trap diameter. A possible genetic determination of this character is discussed. A 1 :1 populational sex ratio for the four species was found during all the periods for Araras and Rifaina and the distribution of the sexes inside the nest was not random, where males were frequently found in the first brood cells. Females were significantly bigger than males for the five traits, showing a higher parental investment in females. The developmental cycle in these species last 30 days and a short diapause was observed in *T. rogenhoferi* and *T. lactitarse* in the cold-dry season. The allozyme analyses indicated that most of the nests show phenotypes according to a monogyny/monandry hypothesis. Although this result clearly suggest that the male-guard behavior confers him the paternity of the female offspring, some extra-pair matings were also observed.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos da Ordem Hymenoptera

A Ordem Hymenoptera é considerada uma das mais importantes para o homem. Além dos benefícios da polinização, do controle biológico e dos muitos produtos que estes insetos fornecem, muitas de suas espécies constituem relevantes organismos-modelo para diferentes áreas da pesquisa biológica. Ordem extremamente heterogênea, abrange mais de 120 mil espécies descritas e várias a serem descobertas (Gauld e Bolton 1996; Goulet e Huber 1993).

A grande adaptabilidade e diversidade desse grupo podem ser conferidas a quatro características biológicas primitivas (Gauld e Bolton 1996):

i) *mecanismo de oviposição*: os himenópteros são insetos holometábolos e a fêmea apresenta, associado ao seu sistema reprodutivo, um ovipositor que, primitivamente, era usado para a postura dos ovos no local escolhido e que, no decurso do processo evolutivo, passou a ter função de aparato de veneno. Este apresenta funcionalidade diversa entre os grupos: em alguns, imobiliza presas para o estágio larval da cria; para outros, serve como um mecanismo de defesa contra grandes organismos e, para os endoparasitóides, funciona como regulador da fisiologia dos hospedeiros.

ii) *provisão parental para a larva*: certamente, a larva do himenóptero ancestral era fitófaga. A fêmea adulta fazia a postura dos ovos próximo a tecidos vegetais e a larva, eruciforme, ia à busca de seu alimento. Porém, os grupos evoluíram de forma a fornecer alimento diretamente às larvas, tanto de forma massal, quanto de forma progressiva. Dessa maneira, o estágio larval, agora vermiforme, fica menos suscetível à predação e o mais alto grau dessa especialização encontra-se nos himenópteros parasitóides.

iii) *dieta larval*: a especialização na dieta larval consiste em armazenar a porção do alimento que não é digerida na porção final do intestino. Dessa forma, a larva dos grupos mais complexos pode sobreviver em locais confinados, como uma célula de aprovisionamento, já que a defecação só ocorre antes da empupação.

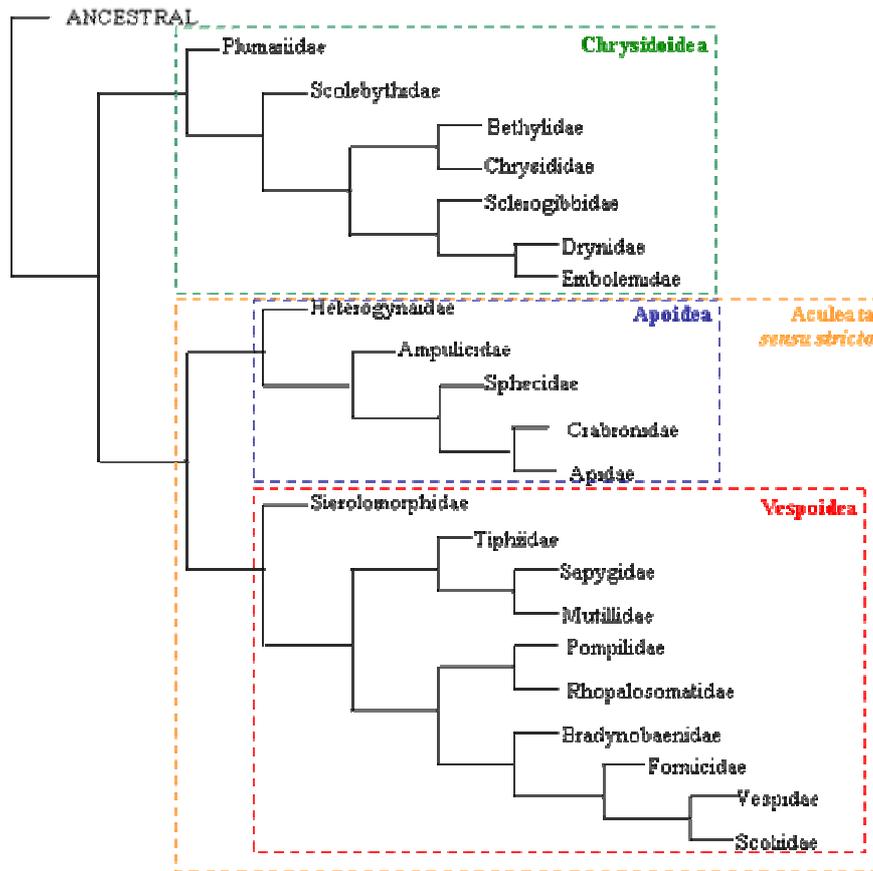
iv) *determinação do sexo*: o mecanismo haplodiplóide de determinação do sexo consiste em gerar machos haplóides, a partir de ovos não fecundados e fêmeas diplóides, a partir de ovos fecundados (arrenotoquia). Esta adaptação tem duas conseqüências importantes na história evolutiva dessa ordem. A primeira é que permite à fêmea escolher o sexo da

progênie em diferentes condições ecológicas (Flanders 1956). Em segundo lugar, a arrenotoquia é um mecanismo capaz de eliminar rapidamente da população genes recessivos deletérios via seleção natural operando no macho hemizigoto (Havron *et al.* 1987).

Uma outra característica desta ordem é a ocorrência de diferentes estágios de socialidade, apresentando desde espécies com comportamento solitário, caracterizado pela independência das fêmeas na construção e aprovisionamento de seus ninhos (Michener 1974), até espécies que apresentam comportamento eusocial, definido como a presença permanente de castas e cuidado aloparental (Crespi e Yanega 1995).

A Ordem Hymenoptera encontra-se dividida em duas subordens, Symphyta e Apocrita, sendo as espécies da segunda dispostas em dois grupos: Parasitica (Terebrantia) e Aculeata. O Grupo Parasitica é formado por espécies parasitóides de outros insetos enquanto Aculeata agrupa todas as espécies capazes de ferrear (Gauld e Bolton 1996). A hipótese mais aceita atualmente sobre a filogenia de Aculeata foi proposta por Brothers (1999) a partir de caracteres morfológicos (Figura 1). Neste grupo, formado pelas superfamílias Chrysidoidea, Vespoidea e Apoidea, são reconhecidos dois clados monofiléticos: Chrysidoidea + Aculeata *sensu stricto* (Figura 1) (Ronquist *et al.* 1999).

A superfamília Apoidea é caracterizada por espécies que apresentam uma constrição abdominal (cintura) e ausência de pernas na fase larval. Esta superfamília é um grupo monofilético formado pelos Apiformes e Efeciformes (Melo 2000). O clado dos Apiformes corresponde ao grupo monofilético das abelhas, uma grande família que possui cerca de 30.000 representantes que fornecem pólen e néctar à progênie (Gauld e Bolton 1996) (Figura 1). O grupo dos Efeciformes é parafilético e contém as famílias Heterogynaidae, Ampulicidae, Crabronidae e Sphecidae *sensu stricto* (Melo 2000) (Figura 1).



**Figura 1.** Filogenia consenso das famílias de Aculeata (Brothers 1999), obtida a partir da análise de caracteres morfológicos.

## 1.2 Vespas Esfécídeas

Grande parte das espécies de vespas esfécídeas é solitária, porém nidificações em densas colônias também ocorrem. Este grupo abrange cerca de 8.000 espécies de vespas, exibindo uma grande variação de formas e hábitos. São cosmopolitas, mas, em alguns continentes como África, Austrália e América do Sul apresentam gêneros endêmicos (Bohart e Menke 1976).

Os adultos apresentam hábitos alimentares variados, incluindo desde néctar a fluidos corpóreos de suas presas, sendo que a maioria das espécies deste grupo é predadora, aprovisionando seus ninhos com espécies diferentes de insetos e aranhas (Bohart e Menke

1976), ou cleptoparasita, depositando seus ovos dentro ou sobre o hospedeiro (Gauld e Boulton 1996).

A maioria das vespas esfecídeas exibe cuidado maternal na forma de construção e provisionamento de um ninho onde os imaturos se desenvolvem até o estágio adulto. Grande parte do tempo e energia das fêmeas é investida nestas atividades e conseqüentemente, a vida reprodutiva de uma fêmea gira em torno de seus ninhos. Em síntese, após emergência e acasalamento, as fêmeas procuram um local para construção do ninho, muitas vezes retornando ao local de onde emergiram e construindo seus ninhos nas proximidades ou reutilizando o ninho natal (comportamento filopátrico). Em seguida, presas são capturadas e trazidas para o ninho; as células de cria são provisionadas com um número variável de presas, em geral mais de uma. Finalmente, a fêmea põe um ovo em uma das presas e fecha a célula (Melo 2000).

Dentre os Esfeciformes, encontra-se a família Crabronidae Latreille 1802. Os adultos deste grupo apresentam hábitos alimentares variados, incluindo desde néctar a fluidos corpóreos de suas presas. A maioria das espécies é predadora, provisionando seus ninhos com uma grande variedade de insetos e aranhas (Bohart e Menke 1976).

Em Crabronidae, a Tribo Trypoxylini agrupa um dos maiores gêneros da família: *Trypoxylon* Latreille 1796, possuindo 660 espécies descritas (Hanson e Menke 1995). Só na região neotropical, são encontradas 167 espécies e subespécies desse gênero (Amarante 2002). Devido a características particulares, como o comportamento de guarda exibido pelo macho, esse gênero pode fornecer indicativos acerca dos mecanismos envolvidos no surgimento e manutenção da eusocialidade, apresentando espécies que exibem comportamento variando do solitário ao quase-social.

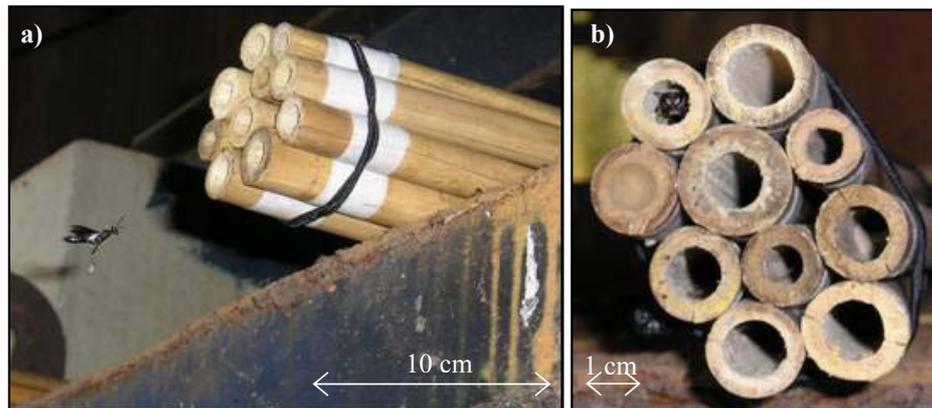
### **1.3 Aspectos do gênero *Trypoxylon***

Richards (1934) dividiu o gênero *Trypoxylon* em dois subgêneros: *Trypoxylon* e *Trypargilum*. Em *Trypargilum* são encontradas cerca de 100 espécies, sendo 89 exclusivas da região neotropical e 64 restritas à América do Sul (Amarante 2002).

São vespas solitárias e a fêmea exibe cuidado maternal na forma de construção e provisionamento dos ninhos, onde os imaturos se desenvolvem até o estágio adulto. Os membros do subgênero *Trypargilum* freqüentemente utilizam cavidades preexistentes para

nidificarem, dividindo-as em séries lineares de células separadas por paredes de barro (Coville 1982).

Uma outra característica que faz do subgênero um bom material de investigação é sua facilidade de amostragem o que, conseqüentemente, facilita estudos de biologia da nidificação. Fêmeas deste subgênero nidificam com enorme sucesso em ninhos-armadilha (Figura 2), o que aumenta consideravelmente a amostragem de ninhos (Camillo e Brescovit 1999).



**Figura 2.** Nidificação de *Trypoxylon rogenhoferi* em ninhos-armadilha. a) fêmea chegando ao ninho; b) macho-guarda. Fotos obtidas em 10/10/04, em Araras.

Em *Trypargilum*, o macho mantém a guarda do ninho (Figura 2b) enquanto a fêmea está forrageando e, com a sua volta (Figura 2a), ocorrem cópulas no interior do ninho (Garcia e Adis 1995). Machos de vespas normalmente não estão envolvidos no comportamento de nidificação, tampouco com o cuidado da prole (Brockmann 1992). No entanto, o comportamento de guarda exibido pelos machos de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) pode resultar em maior garantia de que seus genes sejam passados à próxima geração, além de ser uma forma eficiente de reduzir a taxa de mortalidade causada por predadores, parasitóides e outros inimigos (Coville e Coville 1980).

#### 1.4 Justificativa

Considerando que o número de espécies de insetos é da ordem de milhões (Erwin 1986), não é de se surpreender que muitos grupos apresentem características

particulares e pouco usuais, as quais fazem com que seus representantes constituam modelos para se testar hipóteses de Ecologia e Evolução (Roderick 1996).

Em decorrência de sua diversidade biológica e ao surgimento e manutenção de sistemas sociais em alguns de seus grupos, os himenópteros têm sido objeto de crescente interesse. Estudos sobre biologia, ecologia, genética e etologia conduzidos nesta ordem incluem questões a respeito da biologia da nidificação, produtividade sazonal, provisionamento, razão sexual, alocação sexual, níveis de socialidade, sistemas de acasalamento e parentesco intranidal, níveis de endogamia, dispersão e filopatria, e estrutura populacional.

A ocorrência de espécies multivoltinas, solitárias e com algum grau de cuidado parental em espécies de *Trypoxylon* permite testar algumas questões sobre a biologia destes insetos, entre elas: i) como se dá a biologia de nidificação destas espécies e quais os fatores ambientais que a influenciam? ii) como se estruturam temporal e espacialmente as populações das diferentes espécies de *Trypoxylon*? iii) se há diferenças no investimento sexual, quais as causas e as conseqüências desses desvios? iv) em que espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) o macho exibe comportamento de guarda? v) nas espécies em que tal comportamento é verificado, a permanência do macho no ninho durante sua construção lhe proporciona alguma vantagem reprodutiva?

O subgênero *Trypargilum* é pouco estudado na região Neotropical (América do Sul e Central), onde apresenta a maior diversidade de espécies (Coville 1982). Informações sobre a biologia de nidificação de espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*), aspectos de seu comportamento e, em particular, sobre a genética de suas populações e ninhos são esparsos na literatura. Além disso, raros são os trabalhos neste grupo em que se buscou relacionar aspectos biológicos à genética de populações na tentativa de explicar o sistema de acasalamento nestas espécies.

## 2 OBJETIVOS

Em continuidade aos estudos que vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (Universidade Federal de São Carlos – SP), iniciados em 2000 (Peruquetti 2003; Peruquetti e Del Lama 2003a, 2003b; Boraschi *et al.* 2005; Santoni 2005 e Santoni e Del Lama 2005), os quais visam conhecer a biologia de nidificação e

determinar a estrutura sociogenética nidal e a estrutura populacional de espécies de vespas e abelhas solitárias, este trabalho tem por objetivos:

i) comparar aspectos biológicos como ocorrência, sazonalidade, arquitetura do ninho, razão sexual, forrageamento (aranhas utilizadas), características do pupário, mortalidade e parasitismo de espécies de *Trypoxylon* que nidificam em ninhos-armadilha amostradas em três localidades do Estado de São Paulo (São Carlos, Araras e Rifaina);

ii) relacionar produtividade (quantidade e qualidade da prole), razão sexual e tempo de desenvolvimento a variações ambientais e às características dos sítios de nidificação;

iii) investigar a estrutura genética intranidal e estimar o parentesco intranidal, verificando a utilização do mesmo ninho por mais de uma fêmea e determinando a estrutura sociogenética intranidal, na tentativa de estabelecer o significado do comportamento de macho-guarda.

O cumprimento dos objetivos propostos resultou em um conjunto de dados que, após devidamente analisados e organizados, estão sendo apresentados nesta dissertação na forma de capítulos. Os três primeiros estão relacionados ao primeiro objetivo; o quarto, desenvolve o proposto no segundo objetivo e os dois últimos capítulos apresentam os resultados referentes ao terceiro objetivo. Os capítulos que se seguem têm por título:

**Capítulo 1:** Ocupação diferencial do habitat por vespas do gênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Latreille 1796 (Hymenoptera: Crabronidae) – manuscrito submetido à publicação em janeiro/2008 na Revista Brasileira de Entomologia;

**Capítulo 2:** Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aurifrons* Shuckard (Hymenoptera: Crabronidae) – Santoni, M. M. e M. A. Del Lama. 2007. Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aurifrons* Shuckard (Hymenoptera: Crabronidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 51(3): 369-376.

**Capítulo 3:** Estrutura do pupário de duas espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera: Crabronidae);

**Capítulo 4:** Razão sexual e seleção para tamanho de corpo em espécies de *Trypoxylon* Latreille (Hymenoptera, Crabronidae);

**Capítulo 5:** Caracterização Alozómica e Estutura Genética Populacional e Intranidal de Vespas do Gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae);

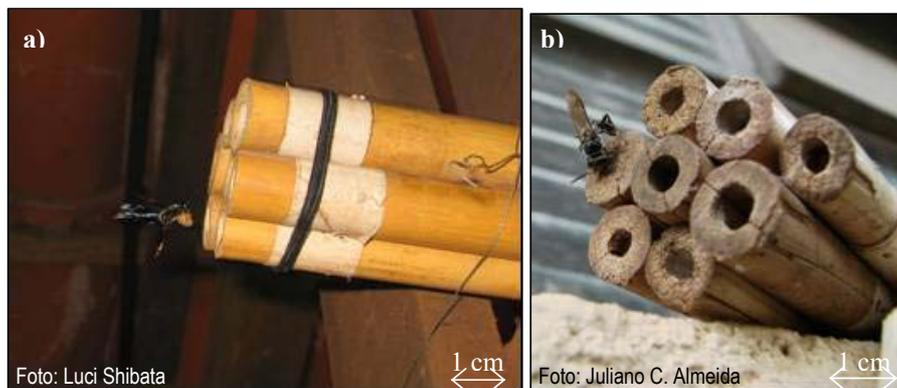
**Capítulo 6:** Caracterização do DNA mitocondrial de *Trypoxylon nitidum* (Hymenoptera: Crabronidae).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Pelo fato desta dissertação estar subdividida na forma de capítulos que resultaram ou resultarão em manuscritos distintos, o cuidado com a redundância das informações deve ser redobrado. Neste sentido, a seguir será descrito em detalhes o material analisado e a maneira como este foi coletado nas diferentes áreas. Seguir-se-á uma descrição geral da metodologia utilizada, enquanto que detalhes específicos da metodologia ou da análise dos dados serão apresentados nos devidos capítulos.

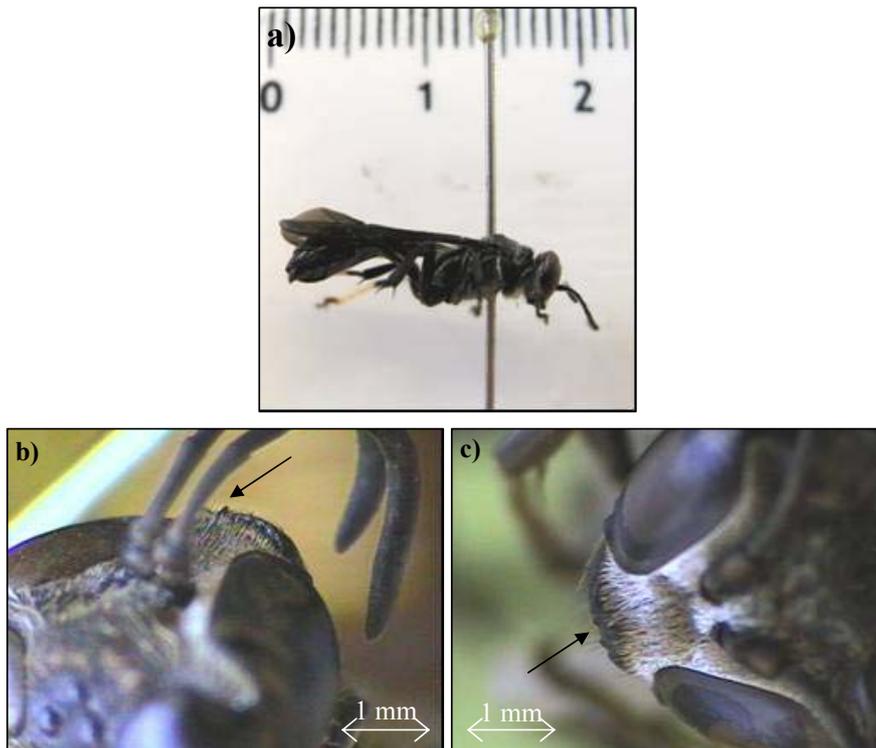
#### 3.1 Espécies estudadas

As espécies estudadas pertencem ao grupo nitidum do subgênero *Trypargilum*, de acordo com a classificação de Coville (1982). As fêmeas das espécies desse grupo coletam barro em solo úmido próximo à linha da água nas margens de rios e lagos para construir paredes que dividem o ninho em uma seqüência linear de células de estoques de aranhas (Figura 3). Elas constroem seus ninhos sozinhas, preferencialmente em cavidades preexistentes, como ninhos abandonados de outros himenópteros (Richards 1934). Assim como os representantes do subgênero *Trypargilum*, os machos das espécies estudadas assumem o comportamento de guarda do ninho.



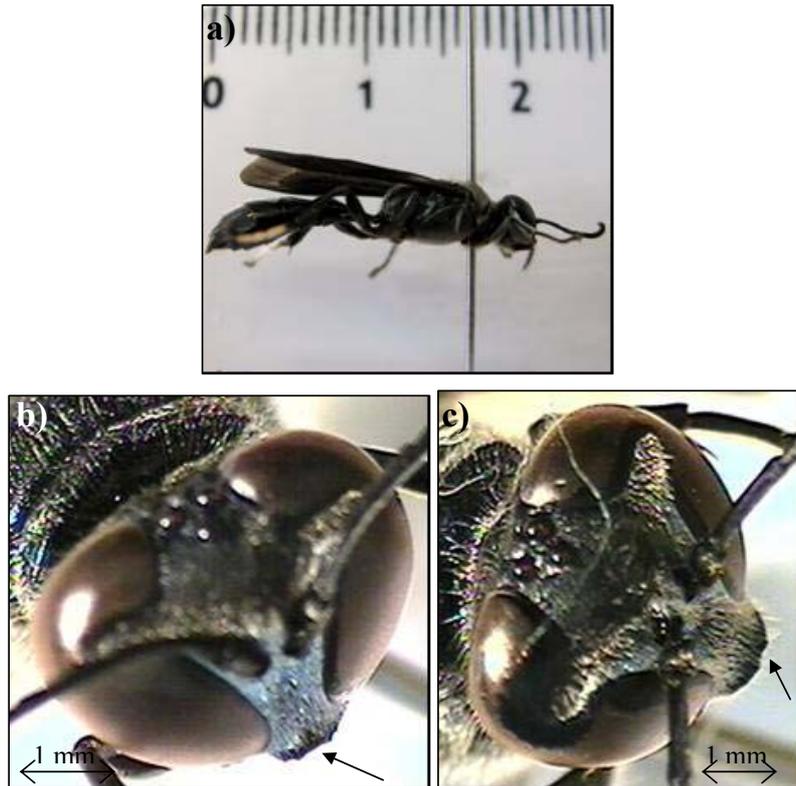
**Figura 3.** a) Fêmea de *Trypoxylon rogenhoferi* com uma porção de barro para nidificação em ninho-armadilha (foto obtida em 20/05/06, em Araras); b) fêmea de *Trypoxylon nitidum* construindo parede de fechamento com barro (foto obtida em 19/01/07, em São Carlos).

*Trypoxylon rogenhoferi* Kohl 1884 (Figura 4) é uma espécie que ocorre desde o sul da Argentina até o norte do Brasil e está agrupada no complexo punctulatum (Coville 1982). Camillo *et al.* (1994) e Camillo e Brescovit (1999), utilizando ninhos-armadilha, caracterizaram a arquitetura do ninho, sazonalidade, aprovisionamento e parasitas desta espécie. Garcia e Adis (1995) elucidaram aspectos sobre o comportamento de nidificação e Peruquetti (2003) estudou aspectos do parentesco intranidal e estrutura genética populacional de *T. rogenhoferi* por meio de marcadores alozímicos. A identificação desta espécie se faz principalmente pelo formato do clipeo de machos (Figura 4b) e fêmeas (Figura 4c).



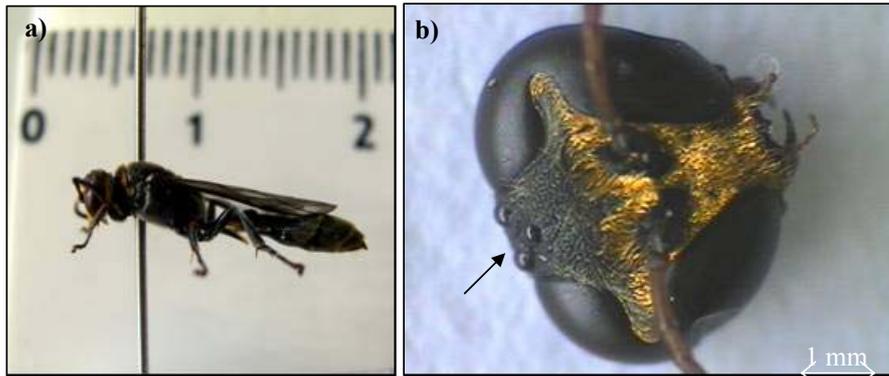
**Figura 4.** *Trypoxylon rogenhoferi*: a) fêmea; b) clipeo de macho, com destaque para a estrutura de identificação; c) clipeo de fêmea, com destaque para a estrutura de identificação. Fotos obtidas em lupa LEICA IM 50 em 25/06/07.

*Trypoxylon lactitarse* Saussure 1867 (Figura 5) é uma espécie que ocorre desde o sul da Argentina até o sul do Canadá (Coville 1982). Semelhantemente a *T. rogenhoferi*, está agrupada no complexo punctulatum e alguns aspectos sobre sua biologia já foram estudados por Buschini (2007), Buschini *et al.* (2006), Camillo e Brescovit (1999) e Camillo *et al.* (1993).



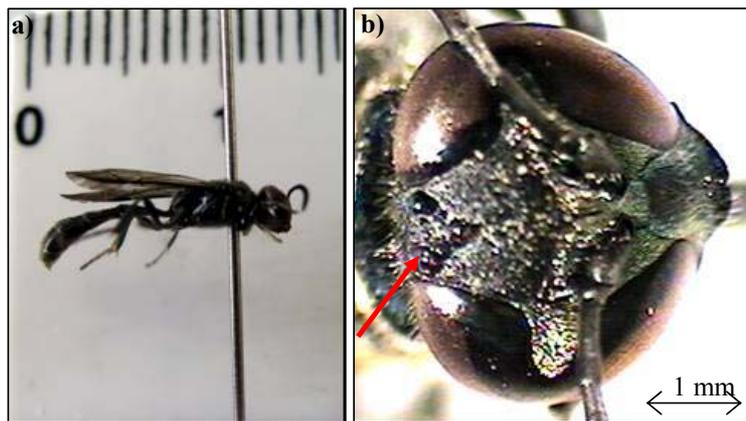
**Figura 5.** *Trypoxylon lactitarse*: a) fêmea; b) clipeo de macho, com destaque na estrutura de identificação; c) clipeo de fêmea, com destaque na estrutura de identificação. Fotos obtidas em lupa LEICA IM 50 em 25/06/07.

*Trypoxylon aurifrons* Shuckard 1837 (Figura 6) é uma espécie neotropical, encontrada em alguns países da América do Sul como Venezuela, Colômbia, Guianas, Paraguai e Brasil (Amarante 2002). Pela classificação de Coville (1982), está agrupada no complexo *nitidum*, divisão de *Trypargilum* que reúne a maioria dos representantes do subgênero e que apresenta características particulares da biologia de nidificação. Dados sobre a biologia de nidificação foram elucidados por Santoni e Del Lama (2007) (Capítulo 2).



**Figura 6.** *Trypoxylon aurifrons*: a) fêmea; b) frente de fêmea, com destaque para a estrutura de identificação – ocelos e frente. Fotos obtidas em lupa LEICA IM 50 em 25/06/07.

*Trypoxylon nitidum* Smith 1856 (Figura 7) é uma espécie cosmopolita, mas encontrada principalmente na região neotropical, com distribuição do Uruguai ao Texas (Amarante 2002). Está agrupada no complexo nitidum e raras são as informações sobre esta espécie (Coville 1982).



**Figura 7.** *Trypoxylon nitidum*: a) fêmea; b) frente de fêmea, com destaque para a estrutura de identificação – ocelos e frente. Fotos obtidas em lupa LEICA IM 50 em 25/06/07.

### 3.2 Local de estudo

Foram amostradas três comunidades de *Trypoxylon* de diferentes localidades do Estado de São Paulo: Araras, São Carlos e Rifaina. Estas localidades apresentam condições

adequadas para ocorrência de nidificação desse gênero, como áreas com vegetação típica de cerrado, Floresta semidecídua, corpos d'água e áreas com pastagem.

O campus da Universidade Federal de São Carlos em Araras (=ARR) (22°18'S, 47°22'W) exibe uma área de 645 hectares. Dentre as construções existentes na área, apresenta prédios antigos circundados por vegetação nativa. Os ninhos-armadilha foram dispostos neste de dezembro de 2003 a outubro de 2007 em 11 sítios diferentes (Tabela I e Figura 8).

**Tabela I.** Sítios de disposição de ninhos-armadilha em Araras, SP.

Sítio	Latitude	Longitude	Altitude	Caracterização
CPM1	22°18'51,6"	47°22'59,0"	700m	Construção próxima ao lago, com entorno de vegetação secundária.
CPM2	22°18'20,8"	47°22'50,0"	637m	
RFT	22°18'51,6"	47°22'59,0"	700m	
GAL	22°18'20,3"	47°22'49,9"	650m	Construção (garagem do <i>campus</i> ) próxima a prédios e monocultura.
GBX	22°18'28,6"	47°22'43,5"	650m	
TRT	22°18'28,1"	47°22'54,1"	673m	
MDT	22°18'30,6"	47°22'54,6"	662m	Construção próxima a pastagem.
LMC	22°18'24,9"	47°22'56,8"	667m	Construção próxima a córrego e vegetação nativa (cerrado).
LMD	22°18'24,9"	47°22'56,8"	660m	
GETAP1	22°18'32,0"	47°22'50,2"	660m	Construção próxima a córrego e monocultura.
GETAP2	22°18'32,0"	47°22'50,2"	660m	



**Figura 8.** Sítios de disposição de ninhos-armadilha no *campus* da Universidade Federal de São Carlos em Araras - SP.

O Campus da UFSCar em São Carlos (=SC) ( $22^{\circ}01'S$ ,  $47^{\circ}53'W$ ) apresenta 230 hectares de extensão e  $145.890\text{ m}^2$  de área construída. Como as nidificações das vespas ocorrem em vários prédios da UFSCar, a área escolhida para amostragem foi a Garagem da Prefeitura Universitária e o Almoarifado Central, por constituírem áreas de pouco acesso. As coletas neste local foram iniciadas em novembro de 2004 e finalizadas em novembro de 2006 e os ninhos-armadilha foram instalados em 3 sítios diferentes (Tabela II e Figura 9).

**Tabela II.** Sítios de disposição de ninhos-armadilha em São Carlos, SP.

Sítio	Latitude	Longitude	Altitude	Caracterização
AMX	$21^{\circ}58'58,2''$	$47^{\circ}52'39,8''$	864	Construção próxima a monocultura e vegetação nativa (cerrado).
MEC	$21^{\circ}58'47,2''$	$47^{\circ}53'05,3''$	848	
URB	$21^{\circ}58'43,8''$	$47^{\circ}53'55,1''$	854	



**Figura 9.** Locais de disposição de ninhos-armadilha no *campus* da Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos - SP.

A Fazenda Rio Branco está localizada em Rifaina (=RF) ( $20^{\circ}00'S$ ,  $47^{\circ}27'$ ). A comunidade de *Trypoxylon* dessa localidade é bem antiga e amostras desta foram coletadas no período de 2000 a 2003 (Del Lama, com. pessoal). Neste trabalho, a disposição de ninhos foi

iniciada em novembro de 2004 e concluída em março de 2007, em sete diferentes sítios (Tabela III e Figura 10).

**Tabela III.** Sítios de disposição de ninhos-armadilha na Fazenda Rio Branco, Rifaina, SP.

Sítio	Latitude	Longitude	Altitude	Caracterização
COL	20°00'26,3"	47°27'13,9"	578m	Construções antigas, próximas a monocultura e vegetação nativa.
SER	20°00'28,6"	47°27'08,8"	577m	
EST1	20°00'26,7"	47°27'05,1"	579m	
EST2	20°00'26,1"	47°27'05,5"	566m	
EST3	20°00'26,3"	47°27'07,1"	572m	
CLS	22°00'27,5"	47°27'11,9"	581m	
TTR	22°00'25,4"	47°27'11,1"	570m	



**Figura 10.** Sítios de disposição de ninhos-armadilha na Fazenda Rio Branco, em Rifaina - SP.

### 3.3 Método de amostragem

Como método de amostragem foram utilizados ninhos-armadilha, construídos a partir de gomos de bambu secos, de comprimentos e diâmetros internos variados. Estes ninhos são fechados em uma das extremidades pelo próprio nó do bambu, abertos longitudinalmente e unidos com fita adesiva (Figura 11).



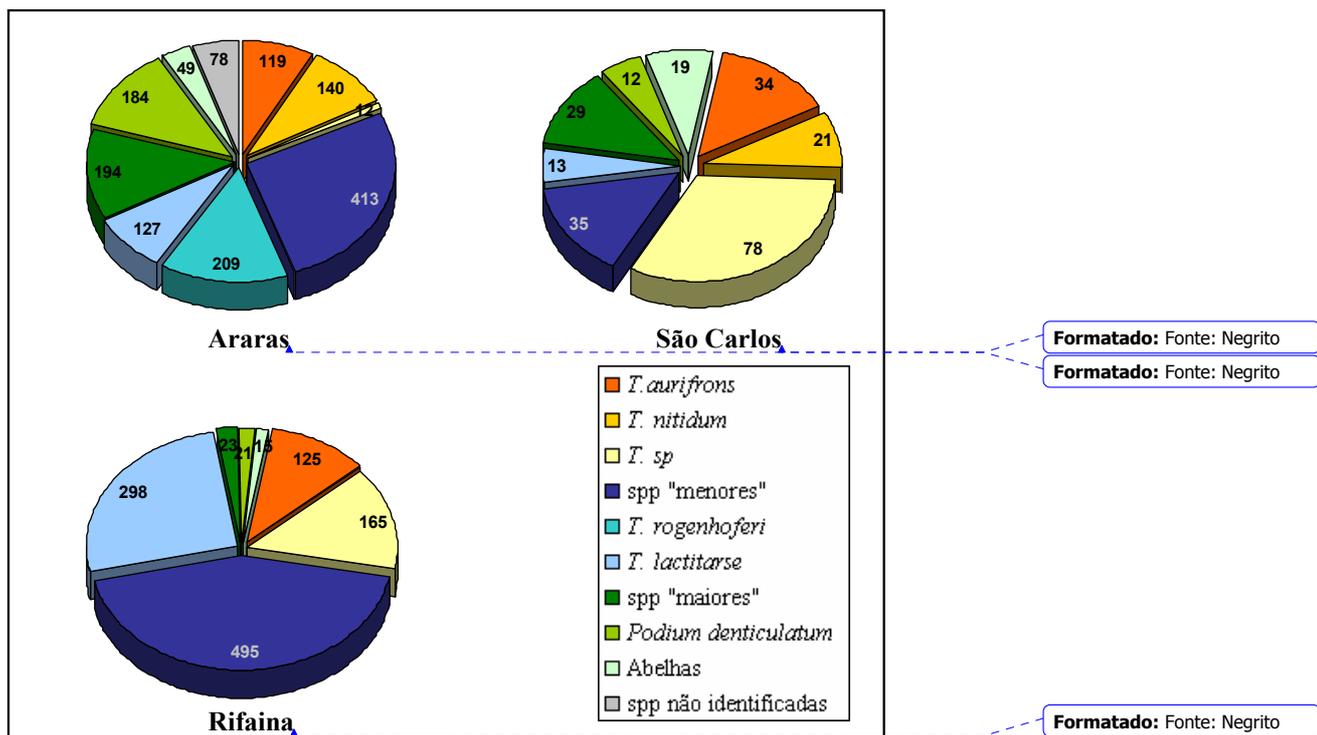
**Figura 11.** Ninho-armadilha construído a partir de bambu seco.

Ninhos-armadilha de comprimento similar foram agrupados em blocos contendo 8-12 tubos e distribuídos nos diferentes sítios de cada localidade, tomando-se o cuidado de oferecer quantidades semelhantes de ninhos-armadilha de variadas dimensões. Foram instalados, aproximadamente, 1.000 tubos de bambu em Araras, 600 em Rifaina e 200 em São Carlos, em cada período de coleta.

Durante o período de estudo, foram realizadas 32 coletas em Araras, 19 em Rifaina e 15 em São Carlos. A periodicidade das coletas foi, em média, 40 dias. Durante as visitas, a inspeção dos ninhos foi realizada com o auxílio de lanterna. Os ninhos completos foram retirados, etiquetados e transportados para o laboratório e, em seu lugar, um novo ninho-armadilha era colocado.

No laboratório, os ninhos foram abertos, tiveram seus dados anotados e os pupários foram individualmente armazenados em frascos de vidro, tendo o cuidado de identificá-los com o número do tubo e a posição por eles ocupada no ninho, determinada a partir do interior deste. Os pupários foram mantidos em local reservado até a emergência dos adultos.

A utilização de bambus de comprimentos e diâmetros internos variados possibilitou a nidificação de quatro espécies, *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse*, *T. aurifrons* e *T. nitidum*, como também de uma quinta espécie não identificada de *Trypoxylon* (*T. sp*), *Podium denticulatum* Smith 1856, algumas espécies de abelhas e outros himenópteros não identificados (Figura 12). Ninhos de *Trypoxylon* em que não ocorreram emergências e, conseqüentemente, não foi possível a identificação da espécie, foram classificados como “spp menores”, para as espécies do grupo *nitidum* e “spp maiores”, para as espécies do grupo *punctulatum*.



**Figura 12.** Abundância de himenópteros que nidificaram em ninhos-armadilha em três localidades do interior de São Paulo. Spp “menores” e spp “maiores” indicam espécies de *Trypoxylon* pertencentes ao grupo nitidum e punctulatum, respectivamente, mas que não apresentaram emergência para permitir a identificação da espécie.

### 3.4 Dados analisados

Todos os bambus nidificados pelas espécies de *Trypoxylon* tiveram comprimento e diâmetro aferidos e número de células contado. Características da arquitetura e biologia intranidal foram observadas, tais como presença de paredes de fechamento e de fundo, células vestibular e intercalar, comprimento das células, comprimento dos pupários, sinais de aprovisionamento, nidificação conjunta com outras espécies, presença de parasitóides, precedência de cada indivíduo da célula de cria correspondente (a ordenação dos indivíduos no ninho se deu do fundo do ninho em direção à abertura do bambu) e viabilidade dos imaturos.

Alguns ninhos que, ao serem abertos, apresentaram os indivíduos em estágio larval, tiveram as aranhas aprovisionadas armazenadas em álcool 70%. Estas amostras foram

identificadas pelo especialista Dr. Antônio Domingos Brescovit (Instituto Butantan – São Paulo).

Cada ninho foi tratado como dado independente, pois a construção dos ninhos não foi monitorada. Para as estimativas de número de células, razão sexual intranidal e razão entre os diferentes tipos de pupários dentro de um ninho foram considerados apenas os ninhos completamente fechados, os quais apresentavam parede de fechamento na extremidade do tubo.

Os adultos emergidos em laboratório tiveram a data de emergência, sexo e massa (peso úmido) anotados e, posteriormente, foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Alguns indivíduos foram montados em alfinetes entomológicos, etiquetados, enviados ao Dr. Sérgio Túlio Pires Amarante (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo) e ao Técnico José Carlos Serrano (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP) para a identificação da espécie e, posteriormente, utilizados na determinação da espécie de novos indivíduos amostrados.

Os dados meteorológicos correspondentes ao período dessa pesquisa foram obtidos na UFSCar *campus* Araras ([www.ufscar.br](http://www.ufscar.br)), na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Pecuária do Sudeste ([www.cppse.embrapa.br](http://www.cppse.embrapa.br)) e no Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura da UNICAMP ([www.unicamp.br](http://www.unicamp.br)).

O período total de desenvolvimento entre a oviposição e a emergência do adulto não foi estudado. No entanto, este período foi estimado com base nos intervalos mínimo e máximo e a média de dias entre a data de coleta dos ninhos e a data de emergência dos adultos. O tempo de emergência intranidal foi estimado a partir do intervalo de tempo entre o primeiro macho e a primeira fêmea emergidos em cada ninho.

Medidas morfométricas foram tomadas em asas de adultos emergidos em laboratório que, posteriormente, foram submetidos a análises genéticas. Os dois pares de asas dos indivíduos foram montados em lâmina, mas apenas as asas direitas foram mensuradas.

As análises alozímicas foram realizadas utilizando a técnica de eletroforese horizontal em gel de amido (Smithies 1955). Os extratos protéicos foram obtidos a partir da cabeça e mesossoma de adultos ou pupas de *Trypoxylon* emergidos em laboratório e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Para a detecção de atividade enzimática sobre os géis foram utilizadas misturas de reação específicas para cada enzima estudada, de acordo com protocolos descritos em Harris e Hopkinson (1976).

Foi extraído o DNA total de mesossoma de indivíduos de *T. nitidum* (n = 18) mantidos a -20°C, de acordo com o método fenol-clorofórmio + proteinase K, descrito por Sheppard e McPheron (1991), com pequenas modificações. Para a amplificação do genoma mitocondrial foram utilizados *primers* universais derivados de insetos (“UBC Insect Mitochondrial DNA *Primers* Kit”) (Simon *et al.*, 1994) e outros desenhados no laboratório de Genética e Evolução de Abelhas – Instituto de Biociências (USP – São Paulo). Os produtos amplificados foram analisados eletroforeticamente em gel de agarose 0,8%, posteriormente corado com brometo de etídeo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ocupação Diferencial do Habitat por vespas do gênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera: Crabronidae)

Mariana Marchi Santoni<sup>1,3</sup>, Antonio Domingos Brescovit<sup>2,4</sup> e Marco Antonio Del Lama<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos. Rodovia Washington Luis (SP – 310), Km 235, 13565.905, São Carlos, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Artrópodes, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, Butantã, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>3</sup>mmsantoni@gmail.com

<sup>4</sup>anyphaenidae@butantan.gov.br

<sup>5</sup>dmdl@power.ufscar.br

**ABSTRACT.** Differential occupation of the habitat by *Trypoxylon* (*Trypargilum*) wasps (Hymenoptera: Crabronidae). Wasps of the genus *Trypoxylon* are solitary and females mass-provision their nests with paralyzed spiders. Some species use successfully trap-nests for nesting foundation, making easier their sampling and study. This paper reports data about nesting biology of four species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) - *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse*, *T. aurifrons* and *T. nitidum*. These species were sampled by trap-nests during three years in Araras and two years in São Carlos and Rifaina (São Paulo). The study areas were subdivided into sampling sites. A total of 2,698 nests of solitary hymenopterans were collected and most of them (2,268) were founded by *Trypoxylon* species. Nesting activity was higher in the warm, rainy season (October-March) in these species. The trap-nests used by the different species showed significantly different dimensions. Araneidae was the spider family mainly used for provision, but a species-specific provisioning was observed. The most important parasitoid of the four species was *Melittobia*, but adult chrysidids, ichneumonids, chalcidids and sarcophagids also attacked their nests. In the three areas, the different species of *Trypoxylon* coexist temporally but each of them builded their nests frequently in a specific site. This result may suggest differential occupation of the habitat. Here is discussed if this habitat partition of an apparently homogeneous area may be a result of an “apparent competition” shaped by shared natural enemies.

**KEYWORDS:** Apparent competition; Araneidae; habitat partition; parasitoid; trap-nest.

**RESUMO.** Ocupação diferencial do habitat por vespas do gênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) (Hymenoptera: Crabronidae). Vespas do gênero *Trypoxylon* apresentam comportamento solitário e aprovisionam seus ninhos de forma massal com aranhas paralisadas. Algumas espécies utilizam cavidades preexistentes para nidificação, o que facilita sua amostragem e estudo. Neste trabalho, dados sobre a biologia de nidificação de quatro espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) - *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* - são apresentados. As espécies foram amostradas por meio de ninhos-armadilha durante três anos em Araras e dois anos em Rifaina e São Carlos (São Paulo). As localidades de estudo foram subdivididas em sítios de amostragem. Foram obtidos 2.698 ninhos de himenópteros solitários, dos quais 2.268 fundados por espécies de *Trypoxylon*. Intensa atividade de nidificação foi observada principalmente na estação quente e chuvosa (outubro-março). Os tubos utilizados para nidificação pelas diferentes espécies apresentaram dimensões significativamente diferentes. A família de aranhas mais utilizada para aprovisionamento foi Araneidae, mas as espécies de vespas diferiram quanto às espécies forrageadas. O principal parasitóide das quatro espécies foi *Melittobia*, mas indivíduos das famílias Chrysididae, Ichneumonidae, Chalcididae e Sarcophagidae também foram verificados. Observou-se que as espécies de *Trypoxylon* coexistem temporalmente e que nas três localidades cada espécie nidificou com maior frequência em um sítio particular, sugerindo ocupação diferencial do habitat. É discutido se a partição do habitat aparentemente homogêneo possa ser resultado de “competição aparente” mediada por inimigos naturais comuns.

**PALAVRAS-CHAVE:** Araneidae; competição aparente; ninho-armadilha; parasitóide; partição de habitat.

#### 4.1.1 Introdução

A ordem Hymenoptera é um grupo diverso e abundante, representando cerca de 13% dos Hexápodos conhecidos (Grimaldi e Engel 2005). Apresenta mais de 120 mil espécies conhecidas e um grande número para serem descritas (Gauld e Bolton 1996; Goulet e Huber 1993). Apesar disto, estes números parecem conservativos, uma vez que estimativas sugerem que pode existir entre 600.000 a 1.200.000 espécies no planeta (Gaston 1991; Grissel 1999). Estes insetos são considerados componentes essenciais e bioindicadores de ecossistemas por agirem como polinizadores, predadores, reguladores de populações de insetos herbívoros e elementos da ciclagem de nutrientes (LaSalle e Gauld 1993; Tscharnke *et al.* 1998).

Dentre outros insetos, esta ordem agrupa espécies de abelhas, vespas e formigas que apresentam diferentes níveis de organização social. Cerca de 90% das espécies de vespas apresenta comportamento solitário, caracterizado pela independência das fêmeas na construção e aprovisionamento das células de cria (O'Neill 2001). Algumas espécies constroem seus ninhos em cavidades preexistentes, como os representantes das famílias Eumenidae, Pompilidae, Sphecidae e Crabronidae (Gauld e Bolton 1996).

*Trypoxylon* Latreille 1796 é o gênero mais diverso dentro da família Crabronidae. Apresenta ampla distribuição geográfica, mas sua maior diversidade está na região Neotropical. O subgênero *Trypargilum* Richards 1934, restrito ao Novo Mundo (Hanson e Menke 1995), é constituído de vespas solitárias cujas fêmeas aprovisionam seus ninhos com aranhas paralisadas.

Vespas do gênero *Trypoxylon* (*Trypargilum*) usualmente nidificam com sucesso em cavidades artificiais (Coville 1982). A utilização de ninhos-armadilha para amostragem destas vespas solitárias tem produzido dados sobre abundância, riqueza e sazonalidade (Camillo *et al.* 1995; Loyola e Martins 2006; Morato e Martins 2006), arquitetura intranidal, utilização de presas e inimigos naturais (Buschini *et al.* 2006; Buschini e Wolff 2006; Camillo 1999; Camillo *et al.* 1993, 1994, Camillo e Brescovit 1999, 2000; Camillo e Brescovit 2000; Coville e Coville 1980; Garcia e Adis 1995; Santoni e Del Lama 2007), comportamento do macho-guarda (Coville e Coville 1980; Brockmann e Grafen 1992) e investimento parental (Peruquetti e Del Lama 2003a).

Este trabalho descreve dados relativos à biologia de nidificação de vespas do subgênero *Trypargilum* em ninhos-armadilha dispostos em três localidades do Estado de São

Paulo. Aspectos como diversidade, abundância sazonal, estrutura de ninhos, presas utilizadas para forrageamento, mortalidade e parasitismo são relatados. Uma possível razão para a utilização diferencial dos sítios de nidificação pelas espécies é discutida.

#### 4.1.2 Material e Métodos

**Áreas de Estudo.** Este estudo foi conduzido em três áreas localizadas no estado de São Paulo: o *campus* de Araras da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (22°18'S, 47°22'W, 629 m), o *campus* da UFSCar em São Carlos (22°01'S, 47°53'W, 850 m) e a Fazenda Rio Branco, localizada no município de Rifaina (20°04'S, 47°25'W, 575 m). Estas áreas apresentam clima Cwa (sistema de Köppen), caracterizado por duas estações bem definidas: uma quente e chuvosa (outubro-março), com pluviosidade elevada e temperaturas acima de 22°C e outra fria e seca (abril-setembro), com baixa precipitação e temperatura abaixo de 18°C.

As coletas em Araras ocorreram entre dezembro de 2003 a março de 2007 em sete sítios; em São Carlos, entre novembro de 2004 a novembro de 2006 em três sítios e, em Rifaina, de julho de 2004 a março de 2007 em seis sítios. Em Araras, todos os sítios estavam localizados no interior de construções antigas, próximos a corpos d'água, com vegetação de entorno muito modificada (monocultura de cana-de-açúcar e/ou pastagem com alguns traços de vegetação natural - cerrado). Em São Carlos, os sítios de nidificação localizavam-se no interior de construções do campus situadas em área de vegetação introduzida (monocultura) e típica (cerrado). Em Rifaina, os sítios estavam localizados em construções antigas próximas a uma vegetação natural que está sendo crescentemente alterada pela introdução de monocultura de cana-de-açúcar. No entanto, dentro de cada área de nidificação (Araras, São Carlos e Rifaina), os sítios escolhidos apresentavam aparente homogeneidade em condições ambientais como temperatura, umidade e luminosidade. Estes sítios estavam distantes entre si de 70 a 380 metros em Araras, de 30 a 101 m em São Carlos e de 42 a 244 m em Rifaina. Ao todo, foram realizadas 32 coletas em Araras, 14 em São Carlos e 19 em Rifaina .

Os dados meteorológicos do período foram obtidos nos sites da UFSCar *campus* Araras ([www.ufscar.br](http://www.ufscar.br)), do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste da EMBRAPA ([www.cppse.embrapa.br](http://www.cppse.embrapa.br)) e do Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura da UNICAMP ([orion.cpa.unicamp.br](http://orion.cpa.unicamp.br)).

**Amostragem.** As espécies foram amostradas utilizando ninhos-armadilha construídos de bambus secos seccionados a cada nó. Estes bambus apresentavam comprimento (100 a 652 mm) e diâmetro interno (4 a 18 mm) variados, eram agrupados em pacotes de 8 a 12 tubos de dimensões similares e horizontalmente dispostos nos sítios das áreas de estudo. Tomou-se o cuidado de dispor quantidades semelhantes de ninhos-armadilha de variadas dimensões em cada sítio. A cada coleta, cerca de 1.000 ninhos-armadilha em Araras, 300 em São Carlos e 500 em Rifaina foram oferecidos e inspecionados a cada 35 a 40 dias, aproximadamente.

Todos os tubos utilizados pelas vespas foram substituídos por novos e transferidos para o Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), onde foram abertos. A maioria dos ninhos que se encontravam em fase de ovo e/ou larva era novamente fechado até que o estágio de pupa fosse atingido. As pupas foram individualmente dispostas em frascos de vidro, identificados com número e posição no ninho e mantidos em local isolado, à temperatura ambiente, até a emergência dos adultos, momento em que a espécie era identificada.

**Dados coletados.** Todos os ninhos-armadilha utilizados pelas espécies de *Trypoxylon* tiveram comprimento e diâmetro aferidos. Cada ninho foi tratado como dado independente, já que a construção dos ninhos não foi monitorada. Características da arquitetura intranidal, tais como paredes de fechamento e de fundo, e presença de parasitóides foram anotadas. Estes parasitóides foram identificados após emergência. Aranhas utilizadas para provisionamento foram retiradas de ninhos com células de cria em estágio de ovo e armazenadas em álcool 70% para posterior identificação por especialista. Todas as aranhas coletadas foram depositadas na coleção do Instituto Butantan (Curador: A. D. Brescovit).

**Análises estatísticas.** As análises estatísticas foram realizadas de acordo com Zar (1999), considerando nível de significância de 5% , utilizando o programa BioEstat 4.0 (Ayres *et al.* 2005). Média ( $\bar{X}$ ) e Desvio Padrão ( $\pm$ ) são apresentados sempre que necessário. Os valores de comprimento e diâmetro dos ninhos-armadilha utilizados pelas fêmeas das espécies de *Trypoxylon* das três localidades foram agrupados. O número de células foi estimado considerando somente os ninhos completamente fechados (parede de fechamento).

A correlação de Pearson foi utilizada para verificar associação entre número de ninhos e número total de células em relação às condições sazonais (média da temperatura diária e pluviosidade total referentes a cada período). Análises de Variância (ANOVA) e teste

de Mann-Whitney foram utilizados para comparar os comprimentos e diâmetros dos ninhos-armadilha utilizados por cada espécie.

#### 4.1.3 Resultados

**Riqueza e Abundância.** Foram fundados 2.698 ninhos por himenópteros solitários nas três áreas, sendo 96% por espécies de vespas das famílias Crabronidae, Sphecidae e Eumenidae e 4% por espécies de abelhas das famílias Megachilidae e Apidae. Foram coletados 1.403 ninhos em Araras, 241 em São Carlos e 1.054 ninhos em Rifaina. As taxas de ocupação dos tubos (ninhos fundados em relação aos ninhos oferecidos) nas três áreas foram 5%, 6% e 12%, respectivamente.

Espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) nidificaram 2.268 ninhos, cerca de resultado em 84% dos ninhos amostrados. Foi verificada emergência de adultos em 1.322 ninhos (58%), produzidos por cinco espécies de *Trypargilum* do grupo *nitidum* (Coville 1982): *Trypoxylon rogenhoferi* Kohl 1884, *T. lactitarse* Saussure 1867, *T. aurifrons* Shuckard 1837, *T. nitidum* Smith 1856 e uma espécie não identificada, *Trypoxylon* sp. Os outros ninhos ou não apresentaram emergência (31%) ou os adultos já haviam emergido no momento da coleta no campo (11%).

Ninhos de *Trypoxylon rogenhoferi* e *T. aurifrons* foram coletados nas três áreas, *T. nitidum* em Araras e São Carlos, e ninhos de *T. lactitarse* e *Trypoxylon* sp foram encontrados apenas em Araras. Esta localidade apresentou o maior número de espécies de *Trypoxylon* e Rifaina, maior abundância (Tabela I). Dado o baixo número de ninhos fundados por *T. sp*, não foi possível obter dados consistentes sobre a biologia da nidificação nesta espécie.

**Distribuição sazonal e espacial.** As espécies de *Trypoxylon* nidificaram durante todo o período de amostragem, mas com maior frequência na estação quente e chuvosa nas três localidades (Fig. 1). O número de ninhos de *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* apresentou correlação significativa com a temperatura média diária (Tabela II).

Em Araras, ao longo de três anos, foi possível observar uma diminuição do número de ninhos fundados por cada uma das espécies estudadas (Fig. 1a). Quarenta e cinco por cento dos ninhos foram coletados entre dezembro/2003 a novembro/2004, 36% entre dezembro/2004 a novembro/2005 e 19% entre dezembro/2005 a março/2007. Foi observada

ocupação preferencial dos sítios, em que cada espécie nidificou com maior frequência em um sítio particular. Este comportamento foi observado nas três localidades (Fig. 2).

Nas três localidades, a predominância de uma espécie em cada sítio foi observada desde as primeiras coletas. Em Araras, os sítios 1 e 4 foram ocupados quase exclusivamente por *T. lactitarse* e *T. rogenhoferi*, respectivamente, enquanto que os sítios 2 e 3 foram ocupados, respectivamente, por *T. nitidum* e *T. aurifrons* (Fig. 2). Para estes últimos sítios, a ocupação predominante de uma espécie foi observada considerando todas as coletas, embora variação nas proporções de espécies durante os meses de amostragem tenha sido verificada.

**Arquitetura dos Ninhos.** As espécies de *Trypoxylon* utilizaram ninhos-armadilha de diferentes comprimentos ( $F = 33,34$ ;  $P = 0,00$ ) e diâmetros ( $F = 143,80$ ;  $P = 0,00$ ), mas foi observada sobreposição dos valores (Tabela III). Teste de Mann-Whitney revelou que valores médios de comprimento e diâmetro do tubo são significativamente diferentes para algumas comparações (Tabela III). Apenas para *T. rogenhoferi* os valores de diâmetro dos tubos utilizados nas três localidades foram significativamente diferentes ( $F = 7,45$ ;  $P = 0,04$ ).

Desconsiderando *Trypoxylon sp.* (devido ao baixo número de ninhos obtidos), a arquitetura intranidal foi semelhante para as espécies estudadas: os ninhos apresentaram parede de fundo (deposição de barro no fundo do tubo) e parede de fechamento (parede de barro construída na extremidade do tubo). As células foram construídas em séries lineares, divididas por paredes de barro (paredes de partição). Células de fundo (célula vazia no fundo do tubo) e células vestibulares (célula vazia entre a parede de fechamento e a última célula aprovionada) foram observadas (Tabela IV).

**Presas coletadas.** Foram amostradas 1.809 aranhas, pertencentes a 11 famílias - Araneidae (93,6%), Tetragnathidae (4,5%), Salticidae (0,8%) e Anyphaenidae (0,5%). As famílias Lycosidae, Mimetidae, Nephilidae, Oxyopidae, Philodromidae, Scytodidae e Uloboridae representaram juntas 0,6% das presas.

Mil e trinta aranhas foram provenientes de 38 ninhos de *T. rogenhoferi*, 12 ninhos de *T. lactitarse*, 15 de *T. aurifrons* e 15 de *T. nitidum*. A alta porcentagem de imaturos amostrados (779 aranhas) dificultou a identificação das espécies, pois os indivíduos nesta fase não apresentam as estruturas da genitália formadas. As aranhas das famílias Mimetidae,

Nephilidae, Scytodidae e Uloboridae foram coletadas em ninhos de *Trypoxylon* que não apresentaram emergência de adultos e, como consequência, a espécie não foi identificada.

As espécies analisadas de *Trypoxylon* utilizaram aranhas de diferentes gêneros e/ou espécies (Tabela V). Nas três localidades, *T. rogenhoferi* apresentou preferência por aranhas do gênero *Alpaida*. *T. lactitarse*, uma espécie mais generalista, forrageou principalmente *Eustala* spp. *T. aurifrons* e *T. nitidum* forragearam preferencialmente *Eustala* gr. *fuscovittata* e *Eustala* spp., respectivamente.

**Mortalidade e inimigos naturais.** Foram amostradas 4.431 células de *T. rogenhoferi*, 826 de *T. lactitarse*, 1.252 de *T. aurifrons* e 887 de *T. nitidum*. A maior taxa de mortalidade ocorreu no estágio de pupa para as quatro espécies (Tabela VI) e foi devida, principalmente, a causas não determinadas. *Melittobia* (Hymenoptera: Eulophidae) foi o principal parasitóide das espécies de *Trypoxylon*. Além deste, vespas das famílias Ichneumonidae, Chalcididae e Chrysididae e moscas da família Sarcophagidae também foram observadas (Tabela VI).

Como esperado, as taxas de emergência e parasitismo em relação ao número de células produzidas pelas espécies estudadas mantiveram-se constantes ao longo das coletas em Araras e Rifaina.

#### 4.1.4 Discussão

A oferta de grande quantidade de ninhos-armadilha de comprimentos e diâmetros variados possibilitou a nidificação de várias espécies de himenópteros solitários, principalmente *Trypoxylon* (*Trypargilum*). A maior diversidade dos ninhos-armadilha oferecida justifica a maior taxa de ocupação verificada neste trabalho quando comparada à de outros estudos (Loyola e Martins 2006; Aguiar e Garófalo 2004).

Muitos fatores podem afetar as taxas de nidificação por espécies de himenópteros solitários que utilizam cavidades preexistentes, como a oferta de cavidades, matéria-prima para construção e disponibilidade de recursos para provisãoamento (Roubik 1989). Cada uma das áreas está particularmente estruturada de acordo com a disponibilidade destes fatores e estas diferenças contribuem para justificar a maior riqueza de espécies em Araras e a maior abundância em Rifaina. Enquanto o primeiro resultado pode ser explicado pela maior disponibilidade de cavidades durante um período maior de amostragem (maior

esforço amostral), a maior abundância verificada em Rifaina pode ser reflexo de uma comunidade estruturada há mais tempo.

Nossos achados confirmam a influência da sazonalidade, possivelmente associada à temperatura média diária, sobre a biologia de nidificação das espécies neotropicais e demonstram a ocorrência temporalmente sincrônica destas espécies, principalmente na estação quente e úmida. Maior taxa de nidificação nesta estação foi também observada nos estudos realizados por Camillo *et al.* (1995), Assis e Camillo (1997) e Loyola e Martins (2006) em *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994) e *T. lactitarse* (Camillo *et al.* 1993; Buschini *et al.* 2006) e *T. opacum* (Buschini e Wolff 2006).

As espécies de *Trypoxylon* estudadas demonstraram preferência pelo diâmetro da cavidade de nidificação, confirmando dados de outros autores (Assis e Camillo 1997; Budrine *et al.* 2004; Buschini *et al.* 2006, Buschini e Wolff 2006; Coville 1982, Coville e Coville 1980; Garcia e Adis 1995). Estes estudos demonstraram que o diâmetro escolhido oscila entre um limite inferior, determinado pelo tamanho do corpo da vespa e da presa utilizada (Garcia e Adis 1995) e um limite superior, definido pela espessura das paredes de barro, uma vez que paredes muito finas não conferem proteção contra parasitóides (Coville e Coville 1980).

As espécies estudadas provisionaram seus ninhos principalmente com aranhas da família Araneidae; no entanto, elas diferiram quanto às espécies utilizadas (Coville 1982). Trabalhos prévios de *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse* confirmam a preferência pelos mesmos gêneros e espécies de aranhas verificados neste trabalho (Buschini *et al.* 2006; Camillo e Brescovit 1999, 2000; Camillo *et al.* 1994; Garcia e Adis 1995). Forrageamento espécie-específico também foi observado em *T. tenocitlan* (Coville e Coville 1980) e *T. antropovi* (Camillo 1999).

Embora tenha sido descrito que as espécies de aranhas capturadas por uma determinada espécie possam variar entre as áreas estudadas e as épocas de nidificação (Camillo e Brescovit 1999), estudos conduzidos em diferentes áreas e épocas relatam que estas vespas apresentam preferência relativamente constante pelas espécies de presas forrageadas (Buschini e Wolff 2006; Buschini *et al.* 2006; Camillo 1999, Camillo *et al.* 1994; Garcia e Adis 1995).

O parasitismo nas espécies de *Trypoxylon* causou cerca de 23% das mortes, porém não foi a principal causa de mortalidade, como observado em outras espécies de *Trypoxylon* (Camillo *et al.* 1993; Camillo *et al.* 1994; Camillo e Brescovit 1999; Garcia e

Adis 1995). *Melittobia*, o principal inimigo natural das espécies aqui estudadas, também foi verificado em outros estudos com *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994; Loyola e Martins 2006), *T. lactitarse* (Camillo *et al.* 1993; Loyola e Martins 2006), *T. politum* (Molumby 1995) e *T. antropovi* (Camillo 1999).

Adultos de Ichneumonidae foram encontrados nos ninhos amostrados, bem como em ninhos de *T. lactitarse* (Assis e Camillo 1997; Buschini *et al.* 2006), *T. rogenhoferi* (Assis e Camillo 1997; Camillo *et al.* 1994), *T. tenoctlilan* (Coville e Coville 1980) e *T. opacum* (Buschini e Wolff 2006). Adultos da família Chrysididae também parasitavam ninhos de *T. tenoctlilan* (Coville e Coville 1980), *T. lactitarse* (Assis e Camillo 1997; Buschini *et al.* 2006; Camillo *et al.* 1993), *T. rogenhoferi* (Assis e Camillo 1997; Camillo *et al.* 1994; Garcia e Adis 1995), *T. opacum* (Buschini e Wolff 2006) e *T. aestivale* (Camillo 1999). Buschini *et al.* (2006) e Buschini e Wolff (2006) verificaram moscas da família Sarcophagidae em ninhos de *T. lactitarse* e *T. opacum*, respectivamente. Os nossos dados e os da literatura indicam, portanto, que as espécies de *Trypoxylon* analisadas neste trabalho têm inimigos naturais comuns.

**Ocupação diferencial do habitat.** A nidificação pelas espécies de *Trypoxylon* apresentou um padrão de distribuição sítio-preferencial, caracterizado pela presença predominante de uma espécie em um sítio específico. Para as quatro espécies, esta predominância foi usualmente observada nas diferentes coletas e a variação na preferência de sítios detectada em Araras em *T. aurifrons* e *T. nitidum* pode ser devida à grande proximidade destes sítios (50m).

A preferência por sítios de nidificação ganha relevância ao se considerar que, nas três áreas de estudo, os sítios escolhidos são muito próximos entre si e, aparentemente, apresentam níveis de temperatura, luminosidade e umidade relativa semelhantes. Em dois dos sítios de nidificação em Araras, foi observada uma baixa taxa de nidificação pelas espécies de *Trypoxylon*. Um destes sítios diferenciava-se dos demais por estar em edificação baixa, mais à sombra e nas proximidades de um curso de água. Nos três anos de coleta realizados em Araras, este sítio foi ocupado quase exclusivamente por *Podium denticulatum* F. Smith, 1856 (Sphecidae) (dados não publicados). O segundo sítio referido se caracterizava por ser uma construção aberta, onde foram capturadas espécies de eumenídeos. Estas espécies apresentam inimigos comuns com as espécies de *Trypoxylon* analisadas (Assis e Camillo 1997).

O padrão de distribuição dos animais tem sido interpretado principalmente como (1) o sub-produto de diferenças fisiológicas, morfológicas e bionômicas, (2) o resultado

de diferentes histórias evolutivas ou (3) o resultado de competição interespecífica, seguida de subsequente especialização para um habitat ótimo (Storch e Frynta 2000).

Por se tratar de espécies-irmãs, as alternativas (1) e (2) parecem não ser relevantes para explicar a ocupação diferencial do habitat pelas espécies de *Trypoxylon*. Alternativamente, a competição interespecífica poderia ser uma explicação para a segregação espacial verificada.

A teoria da competição prediz que a sobreposição de exigências entre espécies em um habitat deve ser minimizada pela segregação temporal ou espacial das mesmas. Dessa forma, preferências por diferentes habitats são comumente explicadas como resultado da especialização ao habitat em que o fitness de uma espécie não é reduzido pela competição com outras espécies (Begon *et al.* 2006). A coexistência temporal destas espécies de *Trypoxylon* que parecem apresentar demandas similares sugere que a partição do habitat poderia ser interpretada como resultado de competição interespecífica, seguida de posterior especialização para habitats ótimos (Rosenzweig 1981), como demonstrado em comunidades de himenópteros por Dietrich e Wehner (2003).

No entanto, as espécies estudadas aparentemente não apresentam sobreposição de recursos para nidificação e forrageamento, uma vez que utilizam ninhos-armadilha de diferentes dimensões e aprovisionam seus ninhos com diferentes espécies de aranhas. Esta suposição é corroborada por Camillo e Brescovit (2000), que reportaram baixa sobreposição de nichos entre *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse* em razão destas espécies não competirem em termos de aprovisionamento.

A ocorrência de ‘competição aparente’ pode ser uma explicação alternativa para esta ocupação diferencial do habitat. Holt (1977) propôs este termo para indicar a redução da densidade populacional de uma espécie quando a densidade de uma segunda espécie aumenta, sendo esta interação mediada pelo aumento numérico de uma terceira espécie de um nível trófico superior. De acordo com este autor, o compartilhamento de inimigos naturais, como observado nas espécies de *Trypoxylon*, pode estruturar uma comunidade da mesma forma que a competição por recursos o faz. Como resultado, espécies que compartilham inimigos naturais devem evoluir para ocupar em simpatria diferentes áreas livres destes inimigos (Jeffries e Lawton 1984).

Padrões de distribuição em mosaico têm sido largamente documentados em comunidades de insetos herbívoros (Rott e Godfray 2000). Morris *et al.* (2001, 2004) e van Veen *et al.* (2005) postulam que, assim como neste grupo, a partição do habitat observada em

outras comunidades de insetos pode ser explicada por competição aparente devido a compartilhamento de parasitóides.

Se a competição aparente é uma alternativa aceitável para a nidificação em mosaico das espécies de *Trypoxylon*, o reconhecimento dos sítios mais vantajosos e a partição do habitat por estas espécies pode ser resultado de aquisições de dicas cognitivas do habitat (Storch e Frynta 2000), dentre as quais: (i) a presença dos primeiros colonizadores de cada espécie, demonstrando a qualidade do sítio, como observado por Mönkkönen *et al* (1997); (ii) a presença de parasitóides nos sítios já colonizados por uma espécie como dica para que outra espécie evite a divisão dos custos do parasitismo.

Neste trabalho, dados sobre a biologia de nidificação de quatro espécies de *Trypoxylon* em três localidades do estado de São Paulo foram relatados. Embora apresentem muitos aspectos semelhantes da biologia de nidificação, as espécies parecem não competir por importantes recursos (substrato para nidificação e presas). Alternativamente, a ocupação diferencial do habitat aparentemente homogêneo pelas espécies de *Trypoxylon* foi justificada por competição aparente mediada pelos inimigos naturais comuns.

A demonstração de que a competição aparente produz padrões de dominância de diferentes espécies em diferentes sítios de nidificação, como sugerida pelos nossos dados, é relevante do ponto de vista teórico e prático. As propostas de manejo de espécies usualmente sugerem o enriquecimento de habitats com elementos que possam ser objeto de competição ou que, de alguma forma, limitem o crescimento das populações-alvo. Se este enriquecimento potencializar o estabelecimento de competição aparente e segregar as espécies em sítios específicos do habitat, o risco de extinções locais pode aumentar, tendo em vista a fragmentação crescente do habitat. Dadas a abundância e a capacidade de nidificação das espécies neotropicais de *Trypoxylon* em ninhos-armadilha, este grupo de vespas permite testar se competição aparente gera partição do habitat e verificar os efeitos desta partição nas taxas de extinção local, contribuindo para o conhecimento dos fatores que devem ser considerados ao se delinear estratégias conservacionistas.

**Agradecimentos.** Ao Dr. Adhemar Rodrigues Alves, dono da Fazenda Rio Branco (Rifaina – SP), ao Dr. Sérgio Túlio Pires Amarante e José Carlos Serrano pela identificação das espécies de *Trypoxylon*, a Rogério Oliveira Souza pela ajuda nas coletas e à Dra. Maria José de Oliveira Campos pela leitura do manuscrito e sugestões. Às agências financiadoras CNPQ (ADB) e FAPESP.

**Tabela I.** Número de ninhos de espécies de *Trypoxylon* coletados em três localidades do estado de São Paulo.

<b>Localidades</b>	<b><i>T. rogenhoferi</i></b>	<b><i>T. lactitarse</i></b>	<b><i>T. aurifrons</i></b>	<b><i>T. nitidum</i></b>	<b><i>T. sp</i></b>	<b>Total</b>
Araras	212	120	118	141	12	603
Rifaina	478		151			629
São Carlos	35		34	21		90
<b>Total</b>	<b>725</b>	<b>120</b>	<b>303</b>	<b>162</b>	<b>12</b>	<b>1322</b>

**Tabela II.** Correlação (r) entre o número de ninhos das espécies de *Trypoxylon* e a temperatura média diária ou a precipitação total referentes às coletas realizadas em Araras – SP.

	<b><i>T. rogenhoferi</i></b>	<b><i>T. lactitarse</i></b>	<b><i>T. aurifrons</i></b>	<b><i>T. nitidum</i></b>
Temperatura	0,42*	0,48*	0,43*	0,49*
Precipitação	0,10	0,06	0,11	0,21

\* P&lt;0,05

**Tabela III.** Comprimento (cm) e diâmetro (mm) dos ninhos-armadilha utilizados pelas espécies de *Trypoxylon*. Teste de Mann-Whitney (U); \* P>0.05. Letras iguais indicam médias semelhantes.

	<b>Comprimento</b>			<b>Diâmetro</b>		
	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>
<b><i>T. rogenhoferi</i></b>	10,5	61,5	27,8 ± 8,5 <sup>a</sup>	5,1	19,2	9,0 ± 2,0 <sup>d</sup>
<b><i>T. lactitarse</i></b>	8,6	44,0	21,8 ± 5,8 <sup>b</sup>	4,5	17,5	9,2 ± 2,3 <sup>d</sup>
<b><i>T. aurifrons</i></b>	11,7	46,7	24,0 ± 6,6 <sup>c</sup>	3,1	16,6	6,7 ± 1,7 <sup>e</sup>
<b><i>T. nitidum</i></b>	14,4	46,7	24,3 ± 5,4 <sup>c</sup>	3,5	11,4	6,5 ± 1,6 <sup>e</sup>

**Tabela IV.** Arquitetura dos ninhos fundados por espécies de *Trypoxylon* em ninhos-armadilha em três localidades do estado de São Paulo (A = amplitude de variação; N = número de observações).

<b>Estrutura do ninho</b>	<b><i>T. rogenhoferi</i></b>	<b><i>T. lactitarse</i></b>	<b><i>T. aurifrons</i></b>	<b><i>T. nitidum</i></b>
Ninhos com mais de uma parede de fundo	3	-	2	-
Ninhos com mais de uma parede de fechamento	55	2	7	10
Número de células por ninho (ninhs completos)	A = 1-17 7 ± 3 N = 471	A = 4-15 8 ± 2 N = 79	A = 1-12 5 ± 2 N = 215	A = 2-13 6 ± 2 N = 87
Comprimento do ninho (cm)	A = 7-36 18,6 ± 8 N = 37	A = 7-14,2 10,1 ± 3 N = 4	A = 5-21,2 12,4 ± 4 N = 28	A = 1-24,9 6,3 ± 7 N = 25
Comprimento da célula de fundo (cm)	A = 0,5-4,0 1,9 ± 1 N = 82	-	A = 0,6-4,0 1,2 ± 1 N = 2	-
Comprimento da célula vestibular (cm)	A = 0,7-5,0 1,5 ± 1 N = 287	A = 1,0-2,8 1,7 ± 1 N = 268	A = 1,0-6,5 2,2 ± 1 N = 35	A = 0,8-3,3 1,6 ± 1 N = 12
Comprimento da célula de macho (cm)	A = 1,2-2,6 1,7 ± 0,4 N = 56	A = 1,4-2,5 1,8 ± 0,3 N = 19	A = 0,7-3,3 1,6 ± 0,5 N = 92	A = 0,9-2,5 1,6 ± 0,5 N = 34
Comprimento da célula de fêmea (cm)	A = 1,2-2,5 1,7 ± 0,3 N = 67	A = 1,4-2,5 1,5 ± 0,3 N = 7	A = 1,0-4,8 1,9 ± 0,7 N = 86	A = 0,8-3,2 1,4 ± 0,5 N = 46

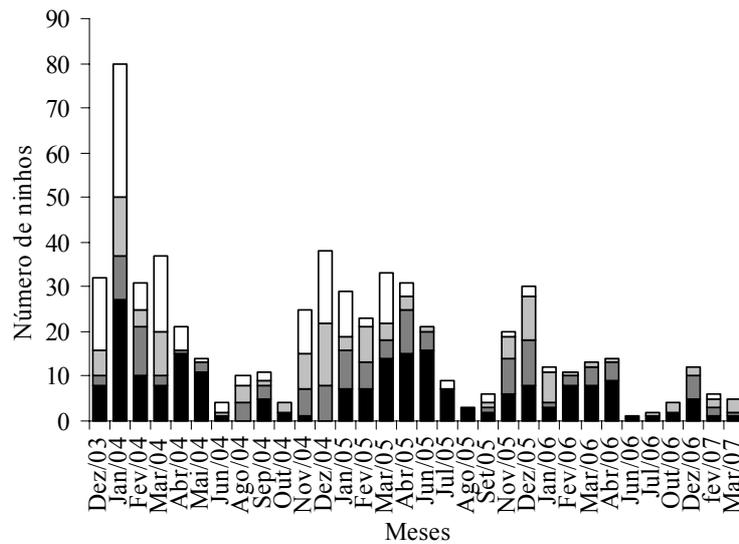
**Tabela V.** Número de aranhas amostradas em ninhos fundados por espécies de *Trypoxylon* em três localidades do interior de São Paulo: a = Araras, r = Rifaina e s = São Carlos.

<b>Classificação</b>	<i>T. rogenhoferi</i>	<i>T. lactitarse</i>	<i>T. aurifrons</i>	<i>T. nitidum</i>
<b>Araneidae</b>	<b>182<sup>a</sup>, 373<sup>r</sup>, 44<sup>s</sup></b>	<b>99</b>	<b>85<sup>a</sup>, 35<sup>r</sup>, 30<sup>s</sup></b>	<b>112<sup>a</sup>, 49<sup>s</sup></b>
<i>Acacesia</i> sp	1 <sup>a</sup>		1 <sup>r</sup>	
<i>Alpaida</i> sp1	1 <sup>r</sup>			4 <sup>a</sup>
<i>Alpaida</i> sp2	1 <sup>r</sup>			
<i>Alpaida</i> spp	76 <sup>a</sup> , 79 <sup>r</sup> , 43 <sup>s</sup>			
<i>Alpaida veniliae</i> <sup>1</sup>	42 <sup>a</sup> , 20 <sup>r</sup>	7		
<i>Araneus</i> spp		1	1 <sup>a</sup> , 3 <sup>r</sup>	
<i>Argiope argentata</i> <sup>2</sup>			3 <sup>r</sup> , 1 <sup>s</sup>	
<i>Eustala</i> spp	3 <sup>a</sup>	12	3 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup> , 3 <sup>s</sup>
<i>Eustala</i> sp1				1 <sup>a</sup>
<i>Eustala</i> sp2				1 <sup>a</sup>
<i>Eustala fuscovittata</i> <sup>3</sup>	1 <sup>r</sup>			
<i>Eustala</i> gr. <i>fuscovittata</i>	1 <sup>a</sup>		19 <sup>a</sup>	
<i>Larinia</i> sp	9 <sup>s</sup>			
<i>Mecynogea</i> sp			1 <sup>r</sup>	
<i>Metazygia</i> sp	2 <sup>a</sup>		4 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
<i>Ocrepeira</i> sp	5 <sup>a</sup> , 10 <sup>r</sup> , 1 <sup>s</sup>			
<i>Wagneriana</i> sp				1 <sup>a</sup>
<b>Anyphaenidae</b>		<b>1</b>		<b>2<sup>s</sup></b>
<i>Anyphaenoides clavipes</i> <sup>4</sup>		1		
<i>Osoriella tahela</i> <sup>5</sup>				1 <sup>s</sup>
<i>Umuara</i> sp				1 <sup>s</sup>
<b>Lycosidae</b>		<b>1</b>		
<b>Oxyopidae</b>				<b>1<sup>s</sup></b>
<b>Philodromidae</b>				<b>2<sup>s</sup></b>
<i>Paracleocnemis</i> sp				1 <sup>s</sup>
<b>Salticidae</b>				<b>1<sup>a</sup>, 4<sup>s</sup></b>
<i>Lyssomanes</i> sp				2 <sup>s</sup>
<b>Tetragnathidae</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>7</b>	<b>1<sup>s</sup></b>	
<i>Leucauge</i> sp			1 <sup>s</sup>	
<i>Tetragnatha</i>	1 <sup>a</sup>			

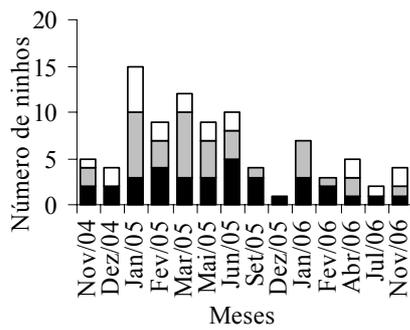
**Tabela VI.** Número de células, taxas de emergência e mortalidade em espécies de *Trypoxylon* de três localidades do Estado de São Paulo. o = ovo, l = larva, p = pupa.

Localidade	<i>T. rogenhoferi</i>	<i>T. lactitarse</i>	<i>T. aurifrons</i>	<i>T. nitidum</i>
<b>Araras</b>				
<b>Células</b>	<b>1481</b>	<b>848</b>	<b>602</b>	<b>803</b>
<b>Emergência</b>	<b>831 (56%)</b>	<b>475 (56%)</b>	<b>264 (44%)</b>	<b>505(63%)</b>
<b>Mortalidade</b>	<b>114<sup>o</sup>, 21<sup>l</sup>, 515<sup>p</sup></b>	<b>106<sup>o</sup>, 6<sup>l</sup>, 261<sup>p</sup></b>	<b>36<sup>o</sup>, 10<sup>l</sup>, 292<sup>p</sup></b>	<b>51<sup>o</sup>, 24<sup>l</sup>, 223<sup>p</sup></b>
<b>Parasitóide</b>	<b>207 (14%)</b>	<b>143 (17%)</b>	<b>128 (21%)</b>	<b>129 (16%)</b>
<i>Melittobia</i>	192	100	125	113
Ichneumonidae	9	40	1	9
Chrysididae	1	3	2	7
Sarcophagidae	5	0	0	0
<b>Causas desconhecidas</b>	<b>443 (30%)</b>	<b>230 (27%)</b>	<b>210 (35%)</b>	<b>169 (21%)</b>
<b>Rifaina</b>				
<b>Células</b>	<b>3007</b>		<b>583</b>	
<b>Emergência</b>	<b>1975 (66%)</b>		<b>351 (60%)</b>	
<b>Mortalidade</b>	<b>260<sup>o</sup>, 80<sup>l</sup>, 692<sup>p</sup></b>		<b>34<sup>o</sup>, 8<sup>l</sup>, 190<sup>p</sup></b>	
<b>Parasitóide</b>	<b>255 (8%)</b>		<b>80 (14%)</b>	
<i>Melittobia</i>	218		61	
Ichneumonidae	10		1	
Sarcophagidae	25		6	
Chrysididae	0		12	
Chalcididae	1		0	
Formicidae	2		0	
<b>Causas desconhecidas</b>	<b>777 (26%)</b>		<b>152 (26%)</b>	
<b>São Carlos</b>				
<b>Células</b>	<b>185</b>		<b>142</b>	<b>84</b>
<b>Emergência</b>	<b>100 (54%)</b>		<b>81 (57%)</b>	<b>37(44%)</b>
<b>Mortalidade</b>	<b>24<sup>o</sup>, 2<sup>l</sup>, 59<sup>p</sup></b>		<b>17<sup>o</sup>, 1<sup>l</sup>, 43<sup>p</sup></b>	<b>11<sup>o</sup>, 36<sup>p</sup></b>
<b>Parasitóide</b>	<b>28 (15%)</b>		<b>17 (12%)</b>	<b>12 (14%)</b>
<i>Melittobia</i>	26		15	11
Ichneumonidae	2			
Chrysididae			2	1
<b>Causas desconhecidas</b>	<b>57 (31%)</b>		<b>44 (31%)</b>	<b>35 (42%)</b>

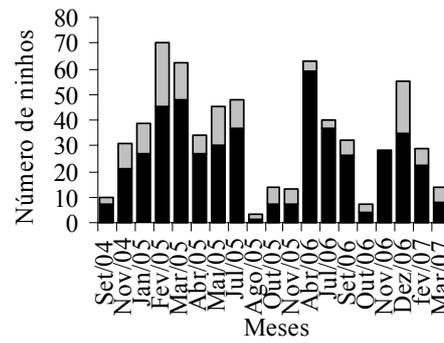
## a) Araras



## b) São Carlos



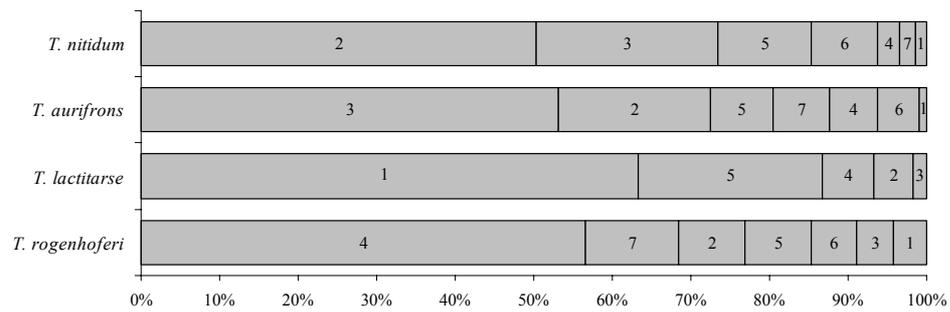
## c) Rifaina



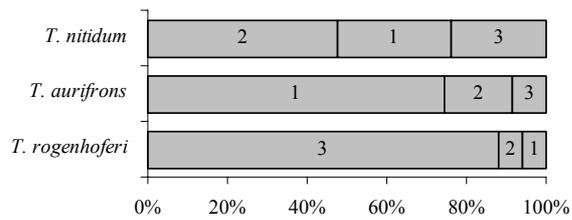
■ *T. rogenhoferi* ■ *T. lactitarse* ■ *T. aurifrons* □ *T. nitidum*

**Figura 1.** Número de ninhos fundados por espécies de *Trypoxylum* em cada amostragem em três localidades do estado de São Paulo.

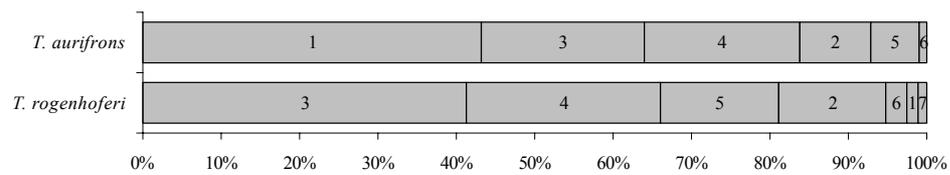
**a) Araras**



**b) São Carlos**



**c) Rifaina**



**Figura 2.** Ninhos fundados por espécies de *Trypoxylon* (em porcentagem) coletados em cada sítio (número nas barras) das três localidades do estado de São Paulo.

**4.2 Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon (Trypargilum)*  
*aurifrons* Shuckard (Hymenoptera: Crabronidae)**

Mariana Marchi Santoni<sup>1,2</sup> e Marco Antonio Del Lama<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros - Departamento de Genética e Evolução  
- Universidade Federal de São Carlos - Rodovia Washington Luis Km 235 - 13565.905 -  
São Carlos - São Paulo - Brasil.

<sup>2</sup>mmsantoni@gmail.com

<sup>3</sup>dmdl@power.ufscar.br

Revista Brasileira de Entomologia 51(3): 369-376, setembro 2007

Received 21/09/2006; accepted 12/06/2007

**ABSTRACT.** Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons* Shuckard 1837 (Hymenoptera: Crabronidae). The present study was carried out in three localities of the state of São Paulo, Brazil: Araras (Dec/03-Dec/06), São Carlos (Nov/04-Nov/06) and Rifaina (Jul/04-Dec/06). Trap-nests were distributed among sites in the sampling areas and were collected every 35 days. Data from 295 nests indicate that *T. aurifrons* is a multivoltine species, with higher rates of nest building and cell production in the warm, rainy season. The trap-nests used by the females ranged from 117 to 467 mm in length and 3.1 to 16.6 mm in diameter. All nests showed deep plugs and a vestibular cell was found in 37% of the complete nests. The number of cells per nest ranged from one to 12. Females were bigger than males, emerged from longer cells and their cocoons were significantly larger. A secondary 1:1 sex ratio was found in Araras and Rifaina. No correlation was observed between the diameter of the trap-nest and sex ratio. Males were usually oviposited in the first brood cells. Male and female developmental time from egg to adult was longer in the cold, dry season. *Trypoxylon aurifrons* provisioned their nests mainly with orb-spiders from the family Araneidae. The most important mortality factor was the death of immature forms, probably due to development failure. The most important parasitoid was *Melittobia* sp..

**KEYWORDS:** nest architecture, parasitoid, prey, sex ratio, seasonality

RESUMO. Biologia da nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons* Shuckard (Hymenoptera: Crabronidae) em ninhos-armadilha. Este estudo foi realizado em três localidades do estado de São Paulo: Araras (dez/03-dez/06), São Carlos (nov/04-nov/06) e Rifaina (jul/04-dez/06). Ninhos-armadilha foram distribuídos em diferentes sítios das áreas amostradas e coletados a cada 35 dias. Dados de 295 ninhos mostraram que *T. aurifrons* é uma espécie multivoltina, com maiores taxas de nidificação e produção de células na estação quente e chuvosa. Os ninhos-armadilha utilizados pelas fêmeas variaram de 117 a 467 mm de comprimento e de 3,1 a 16,6 mm de diâmetro. Todos os ninhos apresentaram parede de fundo e célula vestibular foi constatada em 37% dos ninhos completos. O número de células por ninho variou de um a 12. Fêmeas emergiram de células e pupários maiores, sendo significativamente maiores que os machos. Razão sexual secundária igual a 1:1 foi observada em Araras e Rifaina. Não foi encontrada correlação significativa entre a razão sexual e o diâmetro do tubo. Machos foram encontrados principalmente nas primeiras células de cria. O tempo de desenvolvimento ovo-adulto foi mais longo na estação fria e seca. *Trypoxylon aurifrons* provisionou seus ninhos principalmente com aranhas da família Araneidae. O principal fator de mortalidade foi a interrupção do desenvolvimento das formas imaturas e o parasitóide mais frequentemente encontrado foi *Melittobia* sp..

PALAVRAS-CHAVE: arquitetura intranidal, parasitóide, presas, razão sexual, sazonalidade.

#### 4.2.1 Introduction

Among the Crabronidae, the genus *Trypoxylon* Latreille 1976 encompasses nearly 660 species of cosmopolitan solitary wasps (Hanson e Menke 1995). These insects are considered excellent model-organisms to test theories on parental care (Brockmann 1992; Brockmann e Grafen 1989; Coville e Coville 1980), parental investment (Molunby 1997), sex allocation (Oku e Nishida 1999) and sex ratio (Brockmann e Grafen 1992).

Based on differences in behavior and morphology, Richards (1934) divided this group into two subgenera: *Trypoxylon* and *Trypargilum*. The latter is restricted to the New World (Bohart e Menke 1976) and includes about 100 species, 64 of which are restricted to South America (Amarante 2002).

*Trypargilum* comprises a group of solitary wasps. Each female constructs her nest and provisions it with spiders. Some species nest in preexisting tubular cavities and divide them into a linear series of cells with mud partitions. Unlike most solitary wasps, *Trypargilum* males mate with females when the nest is founded and remain inside until its completion (Coville 1982).

Aspects of the natural history of *Trypargilum* species, such as nest architecture, nest-building time, sex ratio, parental investment, parasites and parasitoids have been described for *Trypoxylon lactitarse* Saussure 1867 (Camillo *et al.* 1993; Camillo e Brescovit 1999; Buschini *et al.* 2006), *T. rogenhoferi* Kohl 1884 (Camillo *et al.* 1994; Garcia e Adis 1995; Peruquetti e Del Lama 2003a), *T. monteverdeae* Coville 1982 (Brockmann 1992), *T. aestivale* Richards 1934 (Camillo 1999), *T. antropovi* Coville 1985 (Camillo 1999) and *T. opacum* (Buschini e Wolff 2006). However, data on the biology of tropical species is scarce in comparison to temperate species.

*Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons* Shuckard is a Neotropical species restricted to Venezuela, Colombia, the Guyanas, Paraguay and Brazil (Amarante 2002). According to Coville's (1982) classification, this species is included in the *nitidum* group, which clusters most of the species from the subgenus. Information on the morphology and taxonomy of *T. aurifrons* can be found in Richards (1934) and Bohart e Menke (1976). However, there is no data on the nesting biology of this species in the literature.

This paper reports aspects of the nesting biology of *Trypoxylon aurifrons* in trap-nests. Our results will allow comparative studies with other Neotropical species from the

subgenus and will also be useful for future studies on population genetics and the intranidal sociogenetic structure of *T. aurifrons*.

#### 4.2.2 Material and Methods

**Study locality.** *Trypoxylon aurifrons* nests were sampled in three localities of the state of São Paulo: the Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) campus at Araras (22°18'S, 47°22'W, 629 m), the UFSCar campus at São Carlos (22°01'S, 47°53'W, 850 m) and Fazenda Rio Branco at Rifaina (20°04'S, 47°25'W, 575 m). These localities are classified as having a Cwa climate (Koeppen system) characterized by two well-defined seasons: one warm and rainy (October-March), with high rainfall and temperatures above 22°C; and the other cold and dry (April-September), with low precipitation and temperatures below 18°C.

Sampling in Araras was from December 2003 to December 2006 at eight sites; sampling in São Carlos was from November 2004 to November 2006 at two sites, and sampling in Rifaina was from July 2004 to December 2006 at six sites. All sites were located in old buildings near a water source.

Thirty collections were made in Araras, 14 in São Carlos and 17 in Rifaina. The meteorological data from the period can be found on the UFSCar campus website ([www.ufscar.br](http://www.ufscar.br)).

**Sampling program.** The trap-nests were made of dry bamboo stems sectioned below each node. Bamboo stems of various lengths (100 to 652 mm) and inner diameters (3.0 and 20.0 mm) were used. Bundles of 8–12 units with similar dimensions were placed horizontally in covered areas at different sites in the study areas. Care was taken to offer a similar number of trap-nests with various dimensions at each site. Approximately 1,000 trap-nests were monthly offered in Araras, 500 in Rifaina and 300 in São Carlos. The trap-nests were checked approximately every 35 days.

The trap-nests used by the wasps were replaced with new ones and transported to the Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), where they were opened. If eggs and/or larvae were present, the nest was closed again until the cocoon stage was reached. Cocoons were individually placed in vials labeled with the numbers of the trap-nest and cell and kept at room temperature until the emergence of the adults, at which time the species were identified.

**Data Collected.** The length and diameter of all trap-nests used by *T. aurifrons* were measured and the number of cells was counted. Since nest construction was not monitored, each progeny was treated as independent data. Aspects of the intranidal architecture, such as closure and deep plugs, and the presence of parasitoids were registered. The emergence, sex and weight (precision to  $\pm 1$  mg) of the adults were recorded. To estimate body size, the forewing length (FWL) of some adults was measured along the edge of the wing from the tegula to the distal end. Direct observations were carried out in São Carlos from December 2005 to March 2006 to estimate the developmental time. This was also indirectly estimated by the average number of days between the collection date and the emergence of adults. Emergence time was estimated from the time interval between the first and last adult emerged from a given nest. Spider provisions were removed from larval brood cells and stored in alcohol 70% for later identification by a specialist.

Some *T. aurifrons* individuals were mounted on entomological pins and sent for identification in order to be used for the identification of new individuals. Specimens were deposited at the Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo and at the LGEH.

**Data analysis.** Statistical analyses were carried out following procedures described by Zar (1999), using BioEstat 4.0 (Ayres *et al.* 2005) and considering a 5% significance level. Mean ( $\bar{X}$ ) and Standard Deviation ( $\pm$ ) were given whenever appropriate.

Length and diameter values of the trap-nests used by *T. aurifrons* females at the three areas were pooled. The number of cells per nest was estimated from nests with a closure plug (complete nests).

Pearson's correlation test was used (i) to determine association between the number of nests and total number of cells in relation to seasonal conditions (average daily temperature and total rainfall of the period) in Araras; (ii) to verify association between the number of cells and the number of nests produced in each period and the number of cells per nest with length of the trap-nest; and (iii) to determine association between male and female weight and FWL.

The Kruskal-Wallis non-parametric test was used to verify differences between the number of cells per nest in each sampling areas. The Mann-Whitney test was used to compare cell and cocoon dimensions of both sexes.

The average values of male and female weight and FWL were compared by the *t* test. Analysis of Variance (ANOVA) with an *a posteriori* Tukey test was used to compare

differences in adult body mass produced at each area over the two seasons. Male and female weight variation were tested for normality by the D'Agostino test. ANOVA was used to compare weight variance between nestmates from nests with at least two males or females to weight variance between individuals from different nests in these two sampling areas.

A  $\chi^2$  test was used to determine whether the secondary sex ratio (based on emerged individuals) deviated from a 1:1 proportion. Parental investment was estimated from the number of males and females produced and the amount of resources spent on each sex (measured by weight). An  $\chi^2$  test was used to compare mortality and parasitism rates as well as the protective role of the vestibular cell. The percentage of males from complete nests where all individuals had emerged was arc-sin transformed and correlated to trap-nest diameter through linear regression to determine whether tube diameter affects the intranidal sex ratio.

#### 4.2.3 Results

**Nesting activity at different sites.** A total of 2,431 nests of solitary bees and wasps were sampled in the three areas, 87% of which were founded by *Trypoxylon* (*Trypargylum*) wasps. A total of 295 nests of *T. aurifrons* were collected: 113 in Araras, 34 in São Carlos and 148 in Rifaina. In these areas, most of the nests were found at a single site (51% in Araras, 85% in São Carlos and 43% in Rifaina).

**Seasonal abundance.** Although *Trypoxylon aurifrons* females constructed their nests throughout the year, most of the nests in Araras (88%), São Carlos (71%) and Rifaina (63%) were collected in the warm, rainy season. As a more regular sampling effort was made in Araras, data from there were used to determine the association between number of nests and climate conditions (Fig. 1). The number of nests had a significant association to the average daily temperature of the period ( $r = 0.47$ ,  $P = 0.01$ ,  $DF = 28$ ), but not to rainfall ( $r = 0.21$ ,  $P = 0.26$ ,  $DF = 28$ ).

A total of 1,252 brood cells from *T. aurifrons* nests were sampled in Araras ( $n = 584$ ), São Carlos ( $n = 142$ ) and Rifaina ( $n = 526$ ). Most (75%) were produced in the warm, rainy season (Fig. 1). As expected, the number of cells had a strong association to the number of nests produced in the period ( $r = 0.87$ ,  $P = 0.00$ ,  $DF = 59$ ). The number of cells in the nests from Araras was significantly correlated to the average daily temperature of the period ( $r = 0.51$ ,  $P = 0.00$ ,  $DF = 28$ ), but not to rainfall ( $r = 0.16$ ,  $P = 0.40$ ,  $DF = 28$ ).

**Nest architecture.** Trap-nests used by *T. aurifrons* had lengths ranging from 117 to 467 mm ( $\bar{X} = 241.3 \pm 6.6$ ,  $n = 295$ ) as well as inner diameters between 3.1 and 16.6 mm ( $\bar{X} = 6.7 \pm 1.7$ ,  $n = 295$ ). Most nests (88%) were built in trap-nests with 150 to 349 mm in length (Fig. 2a) and 5.0 to 9.9 mm in diameter (Fig. 2b).

Complete nests had one to 12 brood cells. On average, five cells were found in each nest. The number of brood cells per nest was significantly lower in São Carlos than in Araras, but no difference was found in the number of cells per nest between Araras and Rifaina or between Rifaina and São Carlos (Kruskal-Wallis:  $H_{\text{Araras} \times \text{São Carlos}} = 11.82$ ,  $P < 0.05$ ;  $H_{\text{Araras} \times \text{Rifaina}} = 1.72$ ,  $P = 0.19$ ;  $H_{\text{Rifaina} \times \text{São Carlos}} = 2.37$ ,  $P = 0.07$ ) (Table 1). No significant correlation was found between the number of cells per nest and the length of the trap-nest ( $r = 0.10$ ,  $P = 0.16$ ,  $DF = 207$ ).

All *T. aurifrons* nests had similar architecture. The partition walls were rough and convex on the inner side, while smooth and concave on the outer side (Table I). A layer of mud before the first brood cell (deep plug) was found in all nests and a double deep plug was found in two nests (0.8%). There was a deep cell (empty cell between the deep plug and first brood cell) in 28 nests (10%). A total of 209 nests had a closure plug at the end of the tube (complete nests) and 26 nests had two closure plugs. In complete nests, 37% had a vestibular cell (an empty space between the closure plug and the last provisioned cell). Brood cells had variable lengths (Table I). Male cells were significantly smaller than female cells in length (Mann-Whitney = 2.85,  $P = 0.00$ ).

**Cocoon.** *T. aurifrons* cocoons were cylindrical, dark brown, somewhat shiny and smooth, with a round posterior end. Cocoons ranged from 7 to 14 mm, with an average length of 11.2 mm ( $\pm 7$  mm;  $n = 209$ ). The male cocoon was significantly shorter than female cocoon (Mann-Whitney = 1.21,  $P = 0.00$ ) (Table II).

**Adults.** *T. aurifrons* females were significantly heavier than males ( $t = 12.31$ ,  $P = 0.00$ ) (Table II). A one-way ANOVA with an *a posteriori* Tukey test confirmed the difference between male and female weights, while also revealing weight differences between individuals of the same sex collected in Araras and Rifaina ( $F_{\text{male}} = 4.95$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{\text{female}} = 4.81$ ,  $P < 0.01$ , respectively). Individuals produced in the warm season were significantly heavier from those produced in the cold season, regardless of sex or origin ( $F = 38.08$ ,  $P = 0.00$ ) (Table II). Weight was normally distributed among *T. aurifrons* males and females from Araras and Rifaina (Table III). ANOVA showed lower weight variance between nestmates than between individuals from different nests (Table III).

Wings from 108 *T. aurifrons* females and 82 males were analyzed (Table II). The weight-at-emergence of *T. aurifrons* adults had a positive and highly significant correlation with FWL for both sexes ( $r_{\text{males}} = 0.72$ ,  $P = 0.00$ ,  $DF = 80$ ;  $r_{\text{females}} = 0.68$ ,  $P = 0.00$ ;  $DF = 106$ ). FWL differences between sexes were also significant ( $t = 7.74$ ,  $P = 0.00$ ).

**Developmental time.** A developmental time from 26 to 31 days ( $\bar{X} = 28 \pm 1.5$ ,  $n = 7$ ) was estimated directly. An indirect estimate through the nests from Araras (where a more regular sampling effort was made) gave an average of  $22.8 \pm 7.2$  ( $n = 97$  males) and  $22.3 \pm 7.3$  days ( $n = 125$  females) in the warm season and  $32.1 \pm 5.5$  ( $n = 17$  males) and  $32.6 \pm 9.4$  days ( $n = 20$  females) in the cold season.

From 155 nests (52%), all individuals emerged at the same day. In 209 nests (71%), the interval between the first and last emergence was five days. This interval reached 21 days in the cold season.

**Sex ratio and distribution.** An overall 1:1 sex ratio was observed in Araras (114 males:145 females;  $\chi^2 = 3.59$ ,  $P = 0.0623$ ,  $DF = 1$ ) and Rifaina (169 males:153 females;  $\chi^2 = 0.795$ ,  $P = 0.4032$ ,  $DF = 1$ ), but not in São Carlos (31 males:50 females;  $\chi^2 = 4.457$ ,  $P = 0.0455$ ,  $DF = 1$ ). Females were 30% bigger than males. The parental investment was female-biased in all three areas: 62% in Araras, 60% in São Carlos and 57% in Rifaina.

The sex ratio was not associated to diameter of the tube in nests where all brood emerged ( $y = -0.008x + 0.6153$ ;  $R^2 = 0.0035$ ;  $P = 0.72$ ;  $DF = 37$ ). However, a higher male production was found in trap-nests with diameters between 4 and 5 mm (Fig. 3). A nonrandom distribution of the sexes inside the nest was observed. Males were usually found in the first provisioned cells (Table IV). In complete nests where all adults emerged, a male ( $n = 12$ ) and female ( $n = 3$ ) single-sex progeny was found.

**Prey.** Spiders from 14 provisioned cells were collected from *T. aurifrons* nests in the rainy ( $n = 143$  spiders) and dry seasons ( $n = 8$  spiders). Of the 151 identified spider prey, 150 (99%) belonged to the family Araneidae. Eight spiders were female, seven were male and 136 were immature (unidentified sex). The most common prey was *Eustala* ( $n = 23$ ), mainly represented by *Eustala gr. fuscovittata* ( $n = 19$ ). *T. aurifrons* also used *Metazygia* sp<sub>1</sub> ( $n = 4$ ), *Argiope argentata* ( $n = 4$ ), *Araneus* spp ( $n = 4$ ), *Acacesia* sp<sub>1</sub> ( $n = 1$ ) and *Mecynogea* sp<sub>1</sub> ( $n = 1$ ). Only one immature specimen from the genus *Leucage* (Tetragnatidae) was sampled, which occurred in São Carlos on February 25, 2005.

In Araras (n = 6 cells), 81% of the spiders were from the genus *Eustala* and 19% were from the genus *Araneus* and *Metazygia*. In São Carlos (n = 3 cells), the most common genera were *Argiope* (100%). In Rifaina (n = 5 cells), the genera *Argiope* and *Araneus* each represented 38% of the captured spiders, while the genera *Acacesia* and *Mecynogea* each constituted 12% of the prey.

**Mortality and natural enemies.** A total of 1,252 brood cells were sampled. Development to adulthood occurred in 53% of cells (Table V). Death of immature forms was observed in 590 cells in the egg (12%), larval (2%) and pupal (86%) stages. Mortality and parasitism rates were significantly different in the three areas ( $\chi^2 = 10.52$ ,  $P = 0.00$ ,  $DF = 2$ ;  $\chi^2 = 15.28$ ,  $P = 0.00$ ,  $DF = 2$ , respectively), with the highest rates in Araras (Table V).

Parasitoids caused the death of 209 brood cells (17%). *Melittobia* sp. (Hymenoptera: Eulophidae) was the most common parasitoid of the *T. aurifrons* nests and was found in 324 cells (26%). During the three years of sampling in Araras, the higher presence of the parasitoid was positively associated to the number of hosts.

Adults from the families Chrysididae, Ichneumonidae and Chalcididae were found in six, two and one nests, respectively. These parasitoids were observed mainly in the last brood cell (6 of the 9 nests) and were found in nests with (3 in 77 nests) or without (6 in 132 nests) a vestibular cell ( $\chi^2_{\text{ind}} = 0.05$ ,  $P = 0.89$ ,  $DF = 1$ ).

#### 4.2.4 Discussion

**Conditions and resources for nest building.** A number of factors affect nest-building rates among Hymenoptera, such as temperature, wind and rainfall, as well as the availability and features of natural cavities (Morato e Martins 2006). Our results indicate that temperature is the main seasonal condition affecting *T. aurifrons* nesting behavior. Similar to other Neotropical wasp species, such as *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994; Camillo e Brescovit 1999), *T. lactitarse* (Camillo e Brescovit 1999; Camillo *et al.* 1993; Buschini *et al.* 2006) and *T. opacum* (Buschini e Wolff 2006), *T. aurifrons* nesting activity was greater during the warm season.

The size and quality of the brood were also affected by the season. Most cells were produced in the warm season. Larger individuals were found in this season as well, regardless of sex. Brockmann e Grafen (1992) observed a seasonal pattern of sex allocation in *T. politum* due to temperature differences. Temperature also affects development time, which

was shorter in the warm season. The development time seen in the three areas suggests that *T. aurifrons* has a development cycle with no diapause. Our results demonstrate that *T. aurifrons* is a multivoltine species, like *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994; Camillo e Brescovit 1999), strengthening Coville's (1982) suggestion that *Trypoxylon* species are bivoltine or multivoltine in tropical and subtropical regions.

Coville (1982) reports that the number of trap-nests available may affect the nest choice of *Trypoxylon* females. Moreover, *Trypoxylon* species require a minimum cavity diameter, which is determined by the body size of the founding female and prey size (Garcia e Adis 1995). The maximum diameter is determined by preventive action against attacks from parasitoids and predators, as greater diameters result in thinner plugs (Coville e Coville 1980).

*Trypargilum* species differ in the number of families of spider preyed and in the percentage of each spider family among the prey (Coville 1982). *T. rogenhoferi* prefers *Alpaida* spiders (Camillo *et al.* 1994; Camillo e Brescovit 1999, 2000; Garcia e Adis 1995); *T. lactitarse* mainly collects *Alpaida* and *Eustala* (Camillo *et al.* 1993; Camillo e Brescovit 1999; Buschini *et al.* 2006); *T. antropovi* uses spiders from the genus *Eriophora* (Camillo 1999); *T. tenocitlan* collects *Metazygia* (Coville e Coville 1980); and *T. opacum* collects *Bertrana* and *Eustala* (Buschini e Wolff 2006).

Although the handling of the cocoons may have produced a biased estimate of the mortality rate, the main mortality factor in *T. aurifrons* was the death of the immature forms, which is a result similar to that found for other species of *Trypoxylon* that use trap-nests (Camillo *et al.* 1993; Camillo *et al.* 1994; Camillo e Brescovit 1999; Garcia e Adis 1995). Parasitoidism of *T. aurifrons* nests resulted in 16% of the deaths. The parasitized cells were generally found in the last cells, as observed by Coville (1982) and Jayasingh e Taffe (1982) in species from this genus.

*Melittobia* sp., which is the main parasitoid of *T. aurifrons*, was found in 324 cells (25.9%), but only caused the death of 205 individuals (16.4%), usually in the egg stage. This parasitoid was also found in *T. antropovi* (Camillo 1999), *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994), *T. politum* (Molumby 1995), *T. lactitarse* (Camillo *et al.* 1993) and *T. antropovi* (Camillo 1999) nests. Adult Ichneumonidae, Chalcididae and Chrysididae were found in *T. aurifrons*, *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994), *T. lactitarse* (Camillo *et al.* 1993), *T. tenocitlan* (Coville e Coville 1980) and *T. antropovi* (Camillo 1999) nests.

**Site distribution of the nests.** *Trypoxylon aurifrons* nesting behavior seems to be site preferential in the three sampling areas. *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse* and *T. nitidum* exhibit similar behavior in the three sampling areas (Santoni e Del Lama, in preparation). Is it possible that resources have affected this “habitat partition” exhibited by *T. aurifrons*?

We disposed a large number of trap-nests with different inner diameter sizes at each nesting site. Thus, there was no lack of substrate or nest construction material that would explain why *T. aurifrons* preferentially nests at one site, while other *Trypoxylon* species preferentially nest at other sites.

Our study confirms previous data on the foraging preference of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) for the Araneidae family and also suggests an absence of interspecific competition for prey among *Trypargilum* species. This species-specific prey preference may be an adaptive response to prevent overlapping in the prey collected (Camillo e Brescovit 1999). If the habitat partition exhibited by *Trypoxylon* species could not be easily explained by interspecific competition, an independent evolution of cognitive abilities to recognize important habitat features (‘clues’, as proposed by Storch e Frynta, 2000) may be an alternative explanation. As the parasitoids found in *T. aurifrons* nests are similar to those of other *Trypargilum* nests, we suggest that the presence of shared natural enemies may be a clue to why one species avoids a site used by another species.

This habitat partition would be reinforced by the presence of the first females as a sign of a safe place for nesting. Phylopatry is an important factor in nest-building site selection in changing habitats (Potts e Willmer 1997) and may be another factor in this behavior. Moreover, the reuse of the parental nest is relatively common among solitary hymenopterans that form aggregations (Roubik 1989). There are no studies on phylopatric behavior in *Trypoxylon* species. Mark-and-recapture studies or molecular genetic analyses are required to confirm such behavior.

**Intranidal structure.** *Trypoxylon aurifrons* nests exhibited features similar to those described for species of the subgenus *Trypargilum* that nest in preexisting cavities (Coville 1982; Coville e Coville 1980; Garcia e Adis 1995; Camillo *et al.* 1993; Camillo *et al.* 1994; Genaro 1996a, 1996b). The presence of a deep plug has been described for other *Trypoxylon* species (Coville e Coville 1980; Garcia e Adis 1995; Camillo *et al.* 1994; Camillo *et al.* 1993; Genaro 1996a, 1996b). Based on the nesting biology of *T. rogenhoferi*, Garcia e Adis (1995) suggest that this behavior is restricted to species whose larvae use mud to make

cocoons, as occurs with *T. aurifrons*, since this plug is destined to the first cell built. Vestibular cells were also found in nests of other *Trypargilum* species that nest in preexisting cavities. However, as proposed by Coville (1982), this structure did not represent a barrier for the parasitoids in *Trypoxylon aurifrons* (present data) and *T. rogenhoferi* nests (Garcia e Adis 1995).

*T. aurifrons* cocoons had the features described by Coville (1982) for the *nitidum* complex cocoon, where the anterior end is truncate, with a prominent nipple. According to Coville (1979), cocoon features are an adequate tool for grouping species: species from the subgenus *Trypoxylon* present fragile cocoons, whereas species from the subgenus *Trypargilum* have hard cocoons, as they incorporate mud in this structure (Garcia e Adis 1995; Krombein 1967). In the present study, the sexes had different cocoon lengths, as in *T. lactitarse* (Camilo *et al.* 1993; Buschini *et al.* 2006), where female cocoons are significantly larger than male cocoons. Similar male and female cocoon lengths were found in *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994), *T. opacum* (Buschini e Wolff 2006) and *T. tenocitlan* (Coville e Coville 1980) as well.

**Adults.** As weight-at-emergence was significantly correlated to FWL, it may be a good estimator for body size in *T. aurifrons*. FWL adequately estimates *Trypoxylon* body size as a consequence of the amount of food the brood receives (Coville e Griswold 1983). *Trypoxylon aurifrons* females emerged from longer cells than males, which is similar to *T. lactitarse* (Buschini *et al.* 2006; Camillo *et al.* 1993) and *T. tenocitlan* (Coville e Coville 1980), but different from *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994, Garcia e Adis 1995). ANOVA analysis demonstrated that nestmates have more similar weight-at-emergence than individuals from different nests, suggesting that a genetic factor affects this trait.

*Trypoxylon aurifrons* allocates more resources to produce larger females, as measured by FWL and weight-at-emergence. Dimorphism for body size is common among solitary hymenopterans. It is a well-registered fact that females are significantly larger than males in *Trypoxylon* species, including *T. lactitarse* (Camillo e Brescovit 1999; Camillo *et al.* 1993; Buschini *et al.* 2006), *T. rogenhoferi* (Camillo e Brescovit 1999), *T. antropovi*, *T. aestivale* (Camillo 1999) and *T. politum* (Brockmann e Grafen 1992; Molumby 1997).

The reproductive success of bees and wasps that supply trophic resources to their brood depends on the maternal phenotype and the choices made by the mother upon laying its eggs (Peruquetti e Del Lama 2003a). Females provision their brood, affecting its size and resulting in the differences observed in some species of Crabronidae (Brockmann e

Grafen 1992; Molumby 1997; Peruquetti e Del Lama 2003a). Thus, the higher allocation of resources to one sex may be a way to maximize fitness.

A number of factors influence the intranidal sex ratio in Hymenoptera, as seen in *Trypoxylon malaisei* Gussakovskij 1933 by (Oku e Nishida 1999). Peruquetti e Del Lama (2003a) demonstrated that male-biased offspring can arise when trap-nests with smaller diameters are used for nest building. However, this was not observed in *T. aurifrons* and *Trypoxylon malaisei* (Oku e Nishida 1999).

Although the sex ratio was not different from 1:1 in Araras and Rifaina, the investment sex ratio was significantly female-biased in the three areas. According to Rosenheim *et al.* (1996), if availability of provisioning resources increases and females become more egg-limited, they may choose one of two strategies: (i) they could increase provision masses per offspring and produce a less male-biased brood; or (ii) they could maintain an equal numerical sex ratio and a more female-biased investment sex ratio. In *Trypoxylon*, sex distribution within the trap-nests is usually nonrandom. In some species, males are found in the first cells and females in the last cells, whereas an inverse arrangement of males and females is found among other species. Studies with *Trypargilum* species (Coville e Coville 1980; Camillo *et al.* 1993; Camillo *et al.* 1994) have demonstrated that males are found in the first cells, as verified herein for *T. aurifrons*.

As 1:1 secondary sex ratio was found, a similar number of nests would be expected with a male or female single-sex progeny. The higher number of male single-sex progeny (13 to 2) suggests nest building by constrained (sperm-depleted or unmated) females. However, males and females from this subgenus mate immediately before or soon after the initial activities of nest construction (Coville 1982). Moreover, we observed the presence of male guards inside all nests built. This finding may alternatively be interpreted as a strategy for optimal sex allocation.

Our findings demonstrate that temperature was the environmental factor that most strongly affected *T. aurifrons* nesting biology and population dynamics. Many intranidal architecture features appeared to be similar to those described for other Neotropical species from this subgenus. These data will support analyses on the intranidal sociogenetic structure of *Trypoxylon aurifrons* and tests on the evolutionary role of the male guarding behavior found only in *Trypargilum* species. The phylopatric behavior and the occurrence of nest building by unfertilized females require further confirmation through molecular genetic analysis.

**Acknowledgements.** We are grateful to Dr. Adhemar Rodrigues Alves, owner of the Fazenda Rio Branco (Rifaina, SP). We thank Servio Tulio Pires Amarante for wasp species identification and Antonio Carlos Brescovit for spider species identification. We are also grateful to Rogério Oliveira Souza for helping in the nest sampling and FAPESP for financial support.

**Table I.** Architecture of *Trypoxylon aurifrons* nests in trap-nests sampled in three localities of the state of São Paulo (N = number of observations).

Nest structure	Amplitude of variation	$\bar{X}$	N
Number of cells per nest (from Araras)	1 – 12	6 ± 2	94
Number of cells per nest (from São Carlos)	1 – 11	5 ± 2	25
Number of cells per nest (from Rifaina)	1 – 12	4 ± 2	90
Thickness of cell partition (mm)	1.3 – 2.7	2.2 ± 0.5	25
Thickness of closure plug (mm)	1.9 – 3.3	2.5 ± 1.5	9
Length of nest (cm)	4.9 – 21.2	12.4 ± 3.9	28
Length of the deep cell (cm)	0.6 – 4.0	1.2 ± 0.9	28
Length of the vestibular cell (cm)	1.0 – 6.5	2.2 ± 1.4	35
Length of the brood cell (cm)	0.6 – 5.0	1.8 ± 0.7	319
Length of male brood cell (cm)	0.7 – 3.3	1.6 ± 0.5	92
Length of female brood cell (cm)	1.0 – 4.8	1.9 ± 0.7	86

**Table II.** Dimensions of male and female cocoons (mm), weight-at-emergence (WE) (mg) and forewing length (FWL) (mm) in *Trypoxylon aurifrons* (N = number of observations).

	Amplitude of variation	$\bar{X}$	N
Male cocoon length	8 – 14	11.5 ± 1.3	73
Female cocoon length	8 – 14	10.6 ± 1.2	54
Male WE	14 – 42	25.3 ± 6.0	255
Female WE	11 – 60	32.9 ± 7.8	285
Male WE - hot season	14 – 42	25.6 ± 5.8	211
Female WE - hot season	11 – 50	33.9 ± 7.3	232
Male WE - cold season	14 – 28	19.8 ± 5.1	44
Female WE – cold season	12 – 43	27.4 ± 7.8	53
Male FWL	5.99 – 8.12	7.24 ± 0.50	82
Female FWL	6.38 – 8.70	7.74 ± 0.44	108

**Table III.** Normality test (F) for male and female weight values and ANOVA test for weight variance between nestmates and between individuals from different nests in Araras and Rifaina - SP.

Test	D'Agostino		ANOVA		
	D	P	F	DF	P
<b>Araras</b>					
Male	0.2824	>0.05	3.09	32	0.001
Female	0.2800	>0.05	3.26	46	0.000
<b>Rifaina</b>					
Male	0.2827	>0.05	1.84	31	0.045
Female	0.2803	>0.05	4.28	28	0.000

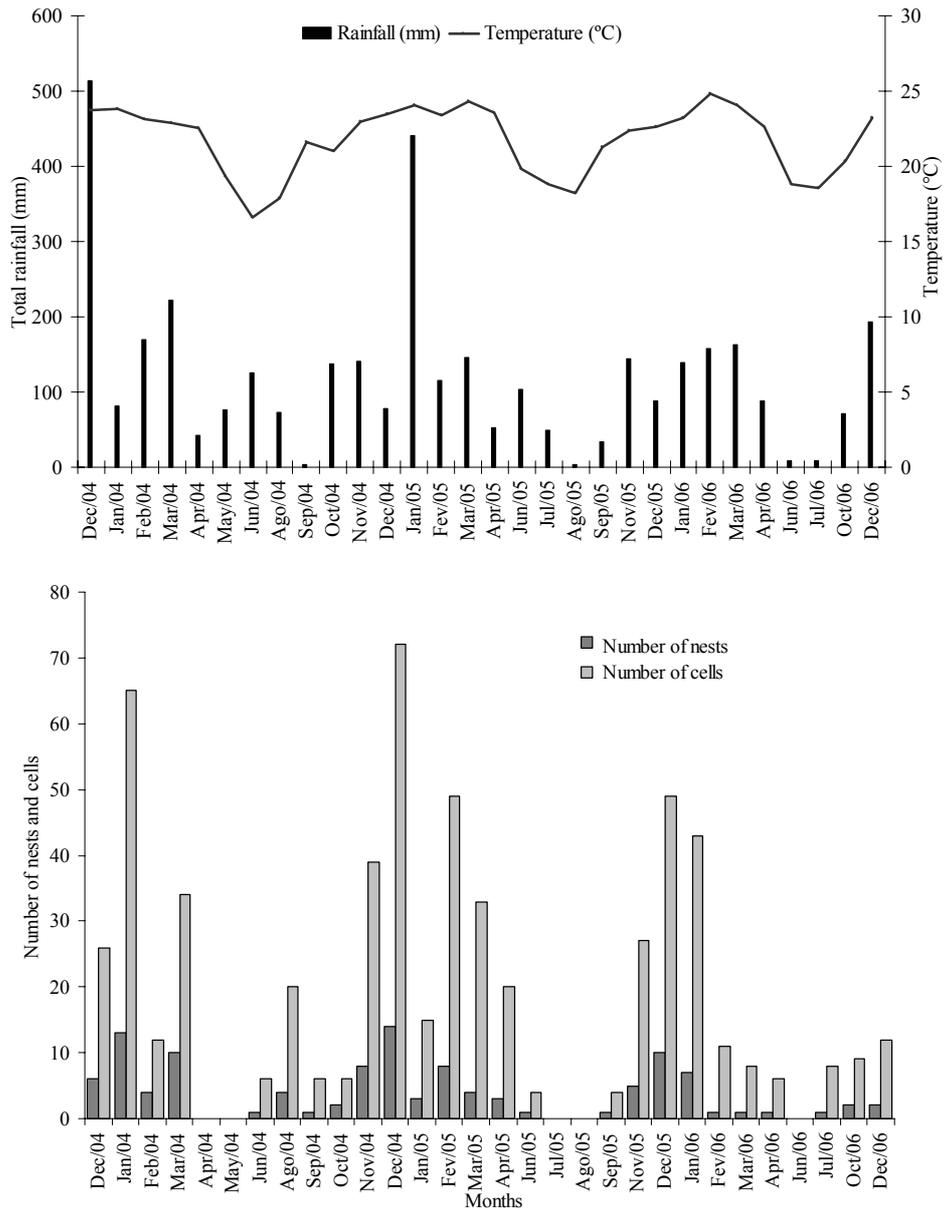
**Table IV.** Percentage of emerged *Trypoxylon aurifrons* males in each cell\* according to their position in the nests (- no emergences).

N° cells per nest	N° of nests	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	17	75											
2	16	78	55										
3	32	50	50	56									
4	38	56	71	21	35								
5	35	82	59	50	43	53							
6	32	62	50	48	45	50	33						
7	23	60	50	60	50	10	45	45					
8	19	75	75	43	0	14	43	80	100				
9	9	100	50	50	67	50	100	25	67	75			
10	7	3	-	0	0	0	0	50	0	0	50		
11	3	3	-	100	100	100	100	0	50	0	0	-	
12	2	1	-	-	-	-	-	0	100	0	-	0	0
Total	233	66	54	45	43	37	45	55	73	55	50	0	0

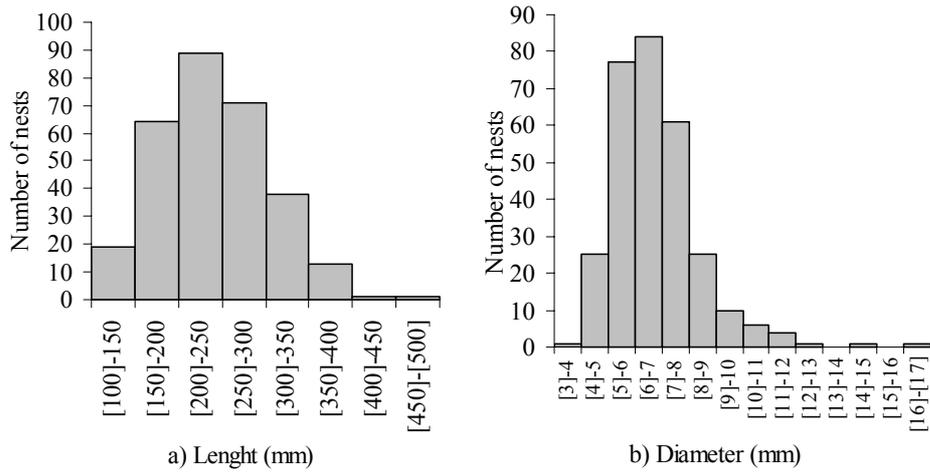
\* Cells are numbered from inner end of nest toward the entrance.

**Table V.** Number of cells, emerged and dead *Trypoxylon aurifrons* individuals collected in three areas of the state of São Paulo.

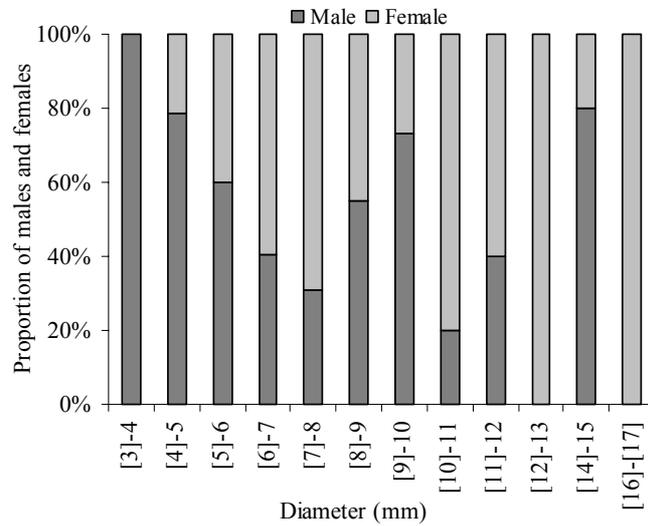
	Araras	São Carlos	Rifaina
<b>Cells</b>	<b>584</b>	<b>142</b>	<b>526</b>
<b>Emerged</b>	<b>259 (44%)</b>	<b>81 (57%)</b>	<b>322 (61%)</b>
<b>Deaths by parasitoids</b>	<b>128(22%)</b>	<b>17 (12%)</b>	<b>64 (12%)</b>
<i>Melittobia</i> sp.	125	15	56
<i>Ichneumonidae</i>	1		1
<i>Chrysididae</i>	2	2	6
<b>Chalcididae</b>			1
<b>By unknown causes</b>	<b>197 (34%)</b>	<b>44 (31%)</b>	<b>140 (27%)</b>



**Figure 1.** Climate conditions and number of *Trypoxylon aurifrons* nests and brood cells obtained monthly during three years of sampling in Araras (SP).



**Figure 2.** Lengths (a) and diameters (b) of the trap-nests used by *Trypoxylon aurifrons*.



**Figure 3.** Proportion of males and females according to the inner diameter of the trap-nest.

### 4.3 Estrutura do pupário de duas espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *rogenhoferi* e *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *lactitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)

#### 4.3.1 Introdução

Utilizando caracteres morfológicos e comportamentais, Richards (1934) dividiu o gênero *Trypoxylon* em dois subgêneros: *Trypoxylon* e *Trypargilum*. As fêmeas do subgênero *Trypoxylon* nidificam em cavidades artificiais como troncos de árvore ou constróem ninhos com barro, como as espécies *T. fabricator* e *T. asuncicola*. A maioria das espécies apresenta comportamento solitário, mas há relatos de que algumas nidificam em agregados. Neste subgênero, o macho não mantém guarda do ninho, encontrando com a fêmea apenas no momento da cópula (Richards 1934).

No subgênero *Trypargilum*, a maioria das fêmeas utiliza cavidades preexistentes para nidificarem, como ninhos vazios de outras espécies, dividindo-as em séries lineares de células separadas por paredes de barro. Nesse subgênero, o macho mantém a guarda no ninho enquanto a fêmea está forrageando e, com a sua volta, ocorrem cópulas no interior do ninho (Coville 1982; Richards 1934).

As características dos pupários também constituem uma boa ferramenta para relacionar as espécies de cada grupo. Espécies do subgênero *Trypoxylon* apresentam pupários frágeis, pois não incorporam barro na sua construção, sendo de uma coloração esbranquiçada ou bege (Richards 1934). Em *Trypargilum*, os pupários são resistentes devido à incorporação de barro em sua constituição. São de coloração marrom-escuro brilhante, envolvidos por tramas de seda, que os prendem às paredes das células de cria.

Krombein (1967) encontrou diferenças diagnósticas na forma dos pupários de várias espécies de *Trypargilum*. Matthews e Matthews (1968) elaboraram inferências filogenéticas baseadas nas propriedades dos pupários e estabeleceram as seguintes conclusões:

- i) Pupários do complexo *spinosum* são os únicos que apresentam um colar que envolve a porção anterior. A área central da porção anterior é truncada e apresenta uma proeminência;
- ii) Pupários do complexo *nitidum* apresentam a porção anterior truncada com proeminência;

iii) Pupários do complexo *punctulatum* apresentam a porção anterior dilatada ou arredondada, quando se encontram em tubos de diâmetro grande.

iv) Pupários de *Trypoxylon tridentatum* Packard 1867, uma espécie distinta do grupo *Nitidum*, apresentam a porção anterior arredondada, com uma coroa levemente granulada e bronzeada (Krombein 1967; Coville 1982);

v) Pupários do grupo *Albitarse* são levemente afunilados na porção anterior, arredondados e apresentam uma coroa áspera e opaca;

vi) Pupário de *Trypoxylon tenocitlan* Richards 1934 (complexo *fugax*, grupo *Nitidum*) é similar ao do complexo *punctulatum* (Coville e Coville 1980).

*Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl 1884 e *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* Saussure 1867 são espécies que ocorrem na região neotropical e, de acordo com Coville (1982), estão agrupadas no complexo *punctulatum*. Trabalhos sobre a biologia de nidificação destas espécies confirmam as características de pupário descritas por Matthews e Matthews (1968) para este grupo, sendo observados pupários de vários tipos em relação à porção anterior (*T. rogenhoferi*: Camillo *et al.* 1994; Garcia e Adis 1995; *T. lactitarse*: Krombein 1967; Coville 1981; Camillo *et al.* 1993; Buschini *et al.* 2006).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os pupários de *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse*, obtidos a partir de ninhos coletados em três regiões do estado de São Paulo, e verificar o efeito de fatores como sexo e diâmetro do ninho-armadilha na frequência do tipo de pupário; por fim, discutir uma possível determinação genética deste caráter.

#### 4.3.2 Material e Métodos

**Área de estudo.** Ninhos das espécies de *Trypoxylon* foram coletados em três áreas localizadas no estado de São Paulo: o *campus* de Araras (22°18'S, 47°22'O, 629 m) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), durante Dezembro de 2003 a Março 2007; o *campus* da UFSCar em São Carlos (22°01'S, 47°53'W, 850 m), entre Novembro de 2004 a Novembro de 2006; e a Fazenda Rio Branco em Rifaina (20°04'S, 47°25'O, 575 m), durante Novembro de 2004 a Março de 2007.

**Amostragem.** As espécies foram amostradas por meio de ninhos-armadilha feitos de bambus secos seccionados entre cada nó. Os bambus, de vários comprimentos (100 a 652 mm) e diâmetros internos (4,0 a 18,0 mm), foram agrupados e distribuídos nas áreas de estudo.

Todos os ninhos-armadilha usados pelas vespas foram substituídos por novos e transportados para o Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), onde foram abertos. Os pupários foram colocados individualmente em frascos de vidro e mantidos em temperatura ambiente até a emergência do adulto, momento que eram identificadas as espécies. Os comprimentos e diâmetros dos ninhos-armadilha utilizados pelas espécies de *Trypoxylon* foram tomados.

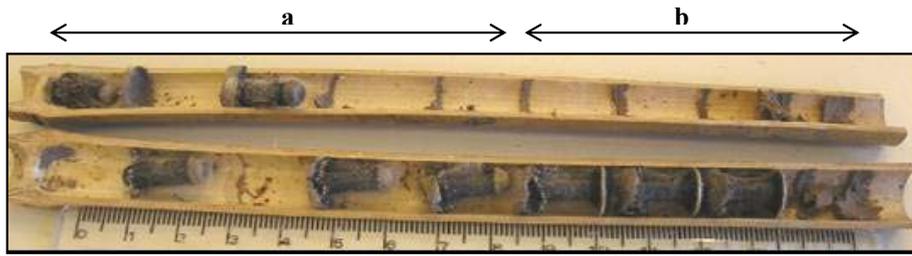
**Análises estatísticas.** As análises estatísticas foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos por Zar (1999), usando o software Statistica para Windows (Release 7.0; Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma) e com nível de significância igual a 5%. Média ( $\bar{X}$ ) e Desvio Padrão ( $\pm$ ) são apresentados quando apropriado.

Para as análises referentes à proporção de pupários dentro de um ninho, foram considerados os ninhos fechados (que apresentavam parede de fechamento de barro na extremidade do tubo). Para verificar possível efeito do diâmetro do tubo sobre a proporção dos tipos de pupário, a porcentagem de pupários de um tipo foi transformada para arcoseno e relacionada ao diâmetro do tubo por regressão linear. Teste de  $\chi^2$  de independência foi utilizado para verificar se havia relação entre o tipo de pupário e o sexo do indivíduo.

### 4.3.3 Resultados

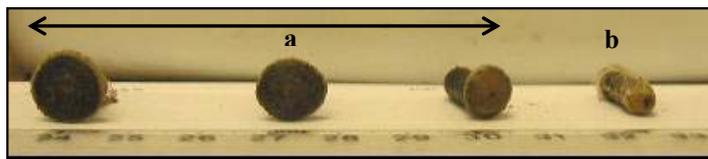
Foram coletados 209 ninhos de *T. rogenhoferi* em Araras, 495 em Rifaina e 35 em São Carlos. *T. lactitarse* foi amostrada somente em Araras, sendo coletados 127 ninhos. *T. rogenhoferi* nidificou em tubos de 10,5 a 61,5 cm de comprimento ( $27,8 \pm 8,5$  cm) e 5,1 a 17,2 (mm) de diâmetro ( $9,0 \pm 2,0$  mm). *T. lactitarse* utilizou cavidades de 8,6 a 44,0 cm de comprimento ( $21,8 \pm 5,8$  cm) e 4,5 a 17,5 mm de diâmetro ( $9,2 \pm 2,3$  cm) (ver Capítulo 1).

Os pupários de *T. rogenhoferi* (n = 4.170) e de *T. lactitarse* (n = 794) apresentaram coloração marrom-escuro brilhante e de estrutura resistente. Estes pupários foram classificados em dois tipos em relação à sua porção anterior: os pupários denominados “D” (dilatado) apresentaram a porção anterior expandida (Figura 1a) e os pupários nominados “ND” (não dilatado), extremidade anterior arredondada (Figura 1b).



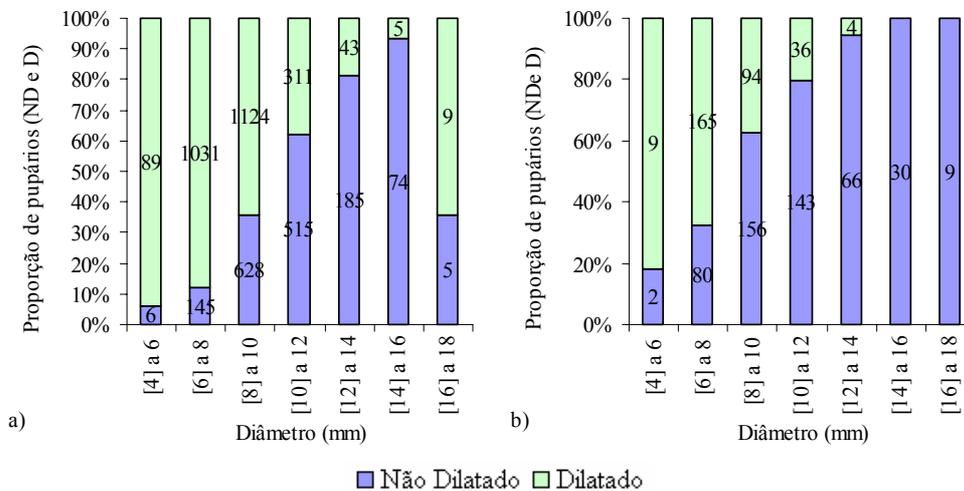
**Figura 1.** Ninho de *Trypoxylon rogenhoferi*, apresentando os tipos de pupários: a) não dilatado; b) dilatado.

Os pupários do tipo “D” apresentaram variações no diâmetro da extremidade expandida de acordo com o diâmetro do ninho-armadilha (Figura 2a): esta região apresentou valor semelhante ao do diâmetro do tubo. Os pupários do tipo “ND” apresentaram a porção anterior com o mesmo diâmetro do restante do pupário, independentemente do diâmetro da cavidade (Figura 2b).



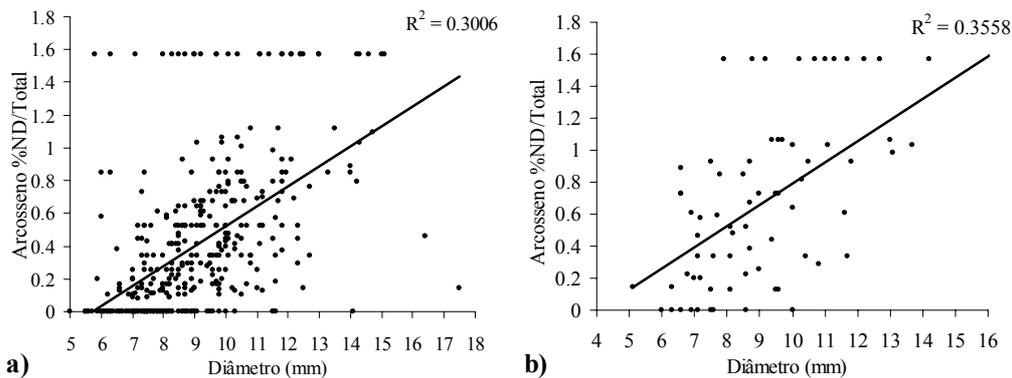
**Figura 2.** Pupários de *Trypoxylon rogenhoferi*. a) pupário do tipo dilatado – as diferentes dimensões de diâmetro acompanham os diferentes diâmetros dos ninhos-armadilha utilizados; b) pupário do tipo não dilatado.

Nas duas espécies, os pupários “D” foram mais frequentes em ninhos-armadilha de menor diâmetro (4,0 a 10,0 mm em *T. rogenhoferi* e 4,0 a 8,0 em *T. lactitarse*) (Figura 3).



**Figura 3.** Proporção de pupários tipo não dilatado (“ND”) e dilatado (“D”) em ninhos de a) *Trypoxylon rogenhoferi* e b) *Trypoxylon lactitarse* amostrados por meio de ninhos-armadilha de diversos diâmetros (mm) em três localidades do estado de São Paulo. As indicações nas barras indicam o número de observações.

Considerando ninhos fechados, foi encontrada prole que apresentava exclusivamente o pupário do tipo “ND” (31 e 12 ninhos para *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse*, respectivamente) ou o pupário do tipo “D” (135 e 9 ninhos para *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse*, respectivamente). Ninhos com prole com os dois tipos de pupários foram os mais comuns para as duas espécies (573 e 106 ninhos para *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse*, respectivamente). Nestes ninhos, a proporção de pupários “ND” em relação aos pupários “D” variou de acordo com o diâmetro do ninho e, desta forma, verificou-se uma influência do diâmetro da cavidade sobre a razão de pupários “ND”, evidenciada por regressão linear (Figura 4). Para esta análise, foram utilizados ninhos fechados e número total de pupários maior que 70% do número de células do ninho (*T. rogenhoferi*: n = 407; *T. lactitarse*: n = 71).



**Figura 4.** Regressão linear mostrando a influência do diâmetro dos ninhos-armadilha, utilizados em três localidades do interior de São Paulo, sobre o arcosseno da razão de pupários não dilatado sobre o total de células de ninhos de a) *Trypoxylon rogenhoferi* ( $y = 0.12x - 0.70$ ;  $F = 174,06$ ;  $gl = 406$ ;  $P = 0,00$ ) e b) *Trypoxylon lactitarse* ( $y = 0.13x - 0.53$ ;  $F = 38,11$ ;  $gl = 70$ ;  $P = 0,00$ ).

Quanto à distribuição do tipo de pupário em relação ao sexo, foi verificado que os pupários do tipo “ND” são mais comuns em machos e os pupários “D”, em fêmeas de *T. rogenhoferi*. Para *T. lactitarse*, os machos são freqüentemente de pupário “ND” e as fêmeas apresentam semelhante proporção dos dois tipos (Tabela I).

**Tabela I.** Proporção de pupários “ND” (não dilatado) e “D” (dilatado) e razão sexual em amostras de *Trypoxylon rogenhoferi* e *Trypoxylon lactitarse* em três regiões do estado de São Paulo.

Proporção	<i>Trypoxylon rogenhoferi</i>			<i>Trypoxylon lactitarse</i>
	Araras	Rifaina	São Carlos	Araras
Pupários “ND” – machos:fêmeas	229:190	501:592	25:15	183:130
Pupários “D” – machos:fêmeas	110:323	181:696	29:35	73:126

A análise do  $\chi^2_{\text{ind}}$  (GL = 1) entre sexo e tipo de pupário apresentou-se significativa para *T. rogenhoferi* (Araras:  $\chi^2_{\text{ind}} = 76,04$ ; Rifaina:  $\chi^2_{\text{ind}} = 136,47$ ; São Carlos:  $\chi^2_{\text{ind}} = 54,56$ ) e *T. lactitarse* (Araras:  $\chi^2_{\text{ind}} = 23,09$ ).

Ao analisar a progênie de um mesmo ninho, foi verificado que, quando um macho apresentou pupário “ND”, os pupários de fêmeas foram dos dois tipos, enquanto que quando o pupário de macho era “D”, as fêmeas apresentaram somente pupários “D”. Por fim, em ninhos com machos nascidos de pupários de ambos os tipos, observou-se semelhante produção em fêmeas (Tabela II).

**Tabela II.** Número de ninhos apresentando o tipo de pupário de cada progênie: pupário não dilatado (ND); pupário dilatado (D).

<i>Sexo e tipo de pupário</i>				<i>Número de ninhos</i>		
<b>Machos</b>		<b>Fêmeas</b>		<i>T. rogenhoferi</i>	<i>T. rogenhoferi</i>	<i>T. lactitarse</i>
ND	D	ND	D	(Araras)	(Rifaina)	(Araras)
x				22	53	21
x	x			8	12	5
x		x		22	31	22
x			x	19	56	12
x	x	x		4	1	1
x		x	x	18	30	9
x	x	x	x	2	5	4
	x			17	79	10
	x	x		0	0	0
	x		x	31	104	5
	x	x	x	1	2	0
		x		9	9	10
		x	x	4	8	3
			x	13	41	10
<b>Total</b>				<b>170</b>	<b>431</b>	<b>112</b>

#### 4.3.4 Discussão

Neste trabalho foi verificado que os pupários de *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse* apresentaram as características descritas por Richards (1934) e por Coville (1982) para o complexo punctulatum: estruturas cilíndricas, resistentes, que contêm barro em sua composição e apresentam variação do diâmetro na parte posterior. Estas características também foram evidenciadas em *T. rogenhoferi* por Camillo *et al.* (1994) e Garcia e Adis (1995) e em *T. lactitarse* por Krombein (1967), Coville (1981), Camillo *et al.* (1993) e Buschini *et al.* (2006).

Até o presente, a observação de pupários com dilatação na parte anterior foi relatada em apenas quatro espécies de *Trypargilum*, pertencentes a dois complexos do grupo nitidum: *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse* e *Trypoxylon evansi* Coville 1882 (Coville 1982), pertencentes ao complexo punctulatum – e *T. tenoctlilan* (Coville e Coville 1980) – pertencente ao complexo fugax.

Nestes trabalhos, os autores relatam pupários com a porção anterior “dilatada” ou “não dilatada”; no entanto, há variação em relação ao número de tipos de pupário para cada espécie. Em *T. rogenhoferi*, Camillo *et al.* (1994) observaram a presença de três tipos de pupários, denominando-os arredondado, expandido e extremamente expandido, ao passo que Garcia e Adis (1995) descreveram dois tipos, denominando-os normal e sino. Em *T. lactitarse* foram detectados dois tipos, definidos como arredondado e expandido por Buschini *et al.* (2006); e três tipos, definidos por Camillo *et al.* (1993) como arredondado, expandido e extremamente expandido. Em *T. tenoctlilan* foram observados quatro tipos de pupários (arredondado, 9,5, 6,4 e 4,8 mm) (Coville e Coville 1980).

Esta variação no número de tipos de pupário pode ser explicada pelos ninhos-armadilha utilizados em cada estudo. Na maioria dos trabalhos em *Trypoxylon* são utilizadas armadilhas de diâmetros definidos (de duas a quatro medidas de abertura); como consequência, aqueles autores observaram tipos exclusivos de pupário para cada diâmetro, sugerindo a presença de vários tipos (um arredondado e vários dilatados).

No presente estudo, a utilização de ninhos-armadilha de vários diâmetros internos permitiu verificar que a porção dilatada do pupário apresenta diâmetro similar ao do ninho-armadilha, assim como proposto por Coville (1982). Desta forma, foi determinada a ocorrência de apenas dois tipos de pupários: os que apresentavam a extremidade dilatada e os que apresentavam a extremidade arredondada.

Este tipo de metodologia também possibilitou verificar que o diâmetro do ninho exerce influência sobre a determinação do tipo de pupário: maior produção de pupário “D” foi verificada nos tubos de menor diâmetro, enquanto que os “ND” foram amostrados em ninhos maiores. Este resultado também foi relatado por Buschini *et al.* (2006), Camillo *et al.* (1993, 1994), Coville e Coville (1980) e Garcia e Adis (1995).

Maior frequência de emergências de machos em pupário do tipo “ND” também foi observada em *T. rogenhoferi* por Garcia e Adis (1995); porém, diferentemente do presente trabalho, os autores observaram maior produção de fêmeas em pupários “ND” (machos – não dilatado:dilatado = 117:10; fêmeas – não dilatado:dilatado = 112:54). Estes dados apresentam

diferença significativa para o teste de independência entre sexo e tipo de pupário ( $\chi^2_{\text{ind}} = 947,36$ ).

Em *T. lactitarse*, Buschini *et al.* (2006) também verificaram maior produção de machos com pupários “ND” mas, diferente do resultado do presente estudo, os autores verificaram que as fêmeas produziram mais o pupário “ND” (machos – não dilatado:dilatado = 82:56; fêmeas – não dilatado:dilatado = 114:49). Não foi observada diferença significativa para o teste de independência entre sexo e tipo de pupário para os dados de Buschini *et al.* (2006) ( $\chi^2_{\text{ind}} = 3,64$ ).

Com relação à distribuição do traço dentro de cada ninho, foram verificados ninhos que apresentavam os dois tipos de pupário; no entanto, a razão de pupários do tipo “ND” em uma progênie mostrou-se dependente do diâmetro do ninho-armadilha (efeito confirmado por regressão linear da razão de pupários “ND” sobre o diâmetro do tubo). Além disso, observou-se um padrão intranidal que relaciona tipo de pupário e sexo do indivíduo.

Estudos envolvendo ninhos-armadilha em *Trypoxylon* têm mostrado que muitos fatores podem influenciar aspectos da biologia de nidificação destas espécies, como a sazonalidade, a abundância de presas e o diâmetro da cavidade de nidificação. Em *Trypoxylon*, havendo predomínio ou exclusividade de diâmetros reduzidos para nidificação são produzidos mais machos (Krombein 1967; Coville e Coville 1980). Molumby (1997) e Peruquetti e Del Lama (2003a) verificaram que o diâmetro do ninho-armadilha influenciou na razão sexual intranidal em espécies de *Trypoxylon*, observando um padrão em que fêmeas são produzidas preferencialmente em ninhos de maior diâmetro. Este resultado também foi encontrado para *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse* do presente estudo (dados apresentados no capítulo 4 desta dissertação).

Se esta informação for aqui considerada, a relação existente entre tipo de pupário, sexo e diâmetro do tubo torna-se uma questão redundante: i) o  $\chi^2_{\text{ind}}$  entre sexo e tipo de pupário é significativo pois pupários de tipo “ND” e machos são mais freqüentes em cavidades de menor diâmetro? ou ii) pelo fato de sexo e tipo de pupário serem relacionados entre si, os pupários do tipo “ND” são mais freqüentemente encontrados em tubos de menor diâmetro, onde há predominância de machos?

Além disso, a construção dos dois tipos de pupário leva também à pergunta: este comportamento tem alguma base genética? Duas observações sustentam esta hipótese: i) o agrupamento filogenético proposto por Matthews e Matthews (1968), o qual demonstra que o caráter parece ser monofilético, apresentando-se apenas no grupo nitidum e tendo uma

provável origem no ancestral comum de *punctulatum* e *fugax*. O caráter “tipo de pupário” em *Trypoxylon* seria uma homologia, portanto; ii) a segregação intranidal da característica nas progênies. Ao analisar cada progênie (Tabela II), pode-se considerar que a característica “tipo de pupário” seja determinada geneticamente de acordo com uma hipótese de herança autossômica monogênica dominante, utilizando os genótipos:  $I^A I^A$  – fêmeas homozigotas, com fenótipo de pupário não dilatado;  $I^A I^B$  – fêmeas heterozigotas, com fenótipo de pupário dilatado;  $I^B I^B$  – fêmeas homozigotas, com fenótipo de pupário dilatado;  $I^A$  – macho hemizigoto, com fenótipo de pupário não dilatado;  $I^B$  – macho hemizigoto, com fenótipo de pupário dilatado.

Esta hipótese genética pode ser inferida pelo fato de que as fêmeas são solitárias e os machos guardam os ninhos. Portanto, é esperado que haja apenas um macho e uma fêmea fundando cada ninho (Coville 1982). Este comportamento de monandria/monoginia foi confirmado por Peruquetti (2003) e pelos nossos dados (Capítulo 5) para a maioria dos ninhos destas espécies. Considerando esta herança, foram determinados os fenótipos dos parentais (Tabela III) a partir da prole. De acordo com o proposto, não são esperadas famílias com machos exclusivamente “D” e fêmeas exclusivamente “ND”, o que está de acordo com o observado (Tabela II).

**Tabela III.** Tipo de pupário de cada progênie e provável genótipo parental para a característica de pupários: “ND”: pupário não dilatado o; “D”: pupário dilatado.

<i>Sexo e tipo de pupário</i>				<i>Genótipo parental</i>	
<b>Machos</b>		<b>Fêmeas</b>		<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>
“ND”	“D”	“ND”	“D”		
x					$I^A I^A$
x	x				$I^A I^B$
x		x		$I^A$	$I^A I^A$
x			x	$I^B$	$I^A I^A$
x	x	x		$I^A$	$I^A I^B$
x		x	x	$I^A$	$I^A I^B$
x	x	x	x	$I^A$	$I^A I^B$
	x				$I^B I^B$
	x	x		-	-
	x		x	$I^A/I^B$	$I^B I^B$
	x	x	x	$I^A$	$I^A I^B$
		x		$I^A$	$I^A I^A$
		x	x	$I^A$	$I^A I^B$
			x	$I^A/I^B$	$I^B I^B$

No presente trabalho, a técnica de utilização de ninhos-armadilha de diversos diâmetros permitiu verificar que a expansão na porção anterior do pupário dilatado tem diâmetro similar ao do tubo. A relação existente entre diâmetro do tubo e tipo de pupário e razão sexual é uma característica interessante a ser explorada em novos estudos. No entanto, uma possível hipótese de herança genética do tipo de pupário deve ser interpretada com cautela, já que o diâmetro do tubo exerce influência na determinação da característica. Novos estudos seriam necessários para verificar esta hipótese de herança monogênica dialélica com penetrância incompleta, dependente do diâmetro do ninho.

#### 4.4 Alocação sexual sazonal em espécies de *Trypoxylon* Latreille (Hymenoptera: Crabronidae)

##### 4.4.1 Introdução

As teorias de alocação ótima de recursos prevêm que os parentais devem maximizar seu sucesso reprodutivo de acordo com o investimento dado à progênie. Uma vez que o investimento parental é limitado, há uma relação entre a quantidade de recursos fornecidos a cada prole e o número de indivíduos produzidos (Strohm e Lechner 2000). Ainda, a teoria de Fisher sobre alocação sexual assume que, em populações panmíticas, o investimento parental será igualmente distribuído entre a progênie feminina e masculina (Fisher 1958).

Variações sazonais de alocação de recursos também surgem como estratégias adaptativas de investimento para otimizar o sucesso reprodutivo em alguns animais (Vila e Cassini 1994; Braby e Jones 1995; Mauck e Grubb 1995). Estas estratégias podem envolver mudanças na razão sexual ou na determinação do número e do tamanho de corpo da prole (Kim e Thorp 2001). Estes desvios são freqüentemente encontrados em himenópteros solitários e atribuídos a fatores ecológicos que variam sazonalmente, como a disponibilidade de recursos (Frohlich e Tepedino 1986; Tepedino e Torchio 1982; Torchio e Tepedino 1980; Kim e Thorp 2001).

As fêmeas dos himenópteros podem determinar o sexo da prole a partir da fertilização ou não de seus ovos, produzindo fêmeas e machos, respectivamente (Flanders 1965). Este sistema haplodiplóide de determinação do sexo permite que a fêmea ajuste o sexo de sua progênie de acordo com o seu sucesso de aprovisionamento e, desta forma, possibilita um aumento de seu próprio sucesso reprodutivo (Molumby 1997). A oviposição de ovos fertilizados ou não, em resposta a condições ambientais, pode ser entendida como uma estratégia condicional que afeta o sucesso reprodutivo da fêmea fundadora, e de sua progênie (Charnov 1979; 1982; Trivers e Hare 1976).

Abelhas e vespas solitárias que aprovisionam suas células de cria de forma massal disponibilizam de uma única vez todo o alimento necessário para o desenvolvimento da larva. As fêmeas do gênero *Trypoxylon* Latreille 1796 (Hymenoptera: Crabronidae) aprovisionam seus ninhos com aranhas paralisadas da família Araneidae, principalmente. O número e o peso da provisão em cada célula de aprovisionamento são considerados medidas

do investimento parental (Brockmann e Grafen 1992; Molumby 1997). Em algumas espécies, foi observada correlação destas medidas com o tamanho de corpo do adulto, o qual está relacionado ao sucesso reprodutivo do adulto (Molumby 1997; Peruquetti e Del Lama 2003a). Desta forma, estes organismos são particularmente interessantes em estudos sobre alocação sexual.

O objetivo deste trabalho foi investigar a alocação sexual de recursos, verificando a influência sazonal no investimento sexual em quatro espécies de *Trypoxylon* coletadas durante três anos em Araras e dois anos em Rifaina (SP).

#### 4.4.2 Material e Métodos

**Espécies estudadas.** *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl 1884, *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* Saussure 1867, *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons* Shuckard 1837 e *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* Smith 1856 são espécies de vespas solitárias encontradas principalmente na América do Sul (Amarante 2002) que nidificam durante todo o ano, principalmente entre novembro e março (Capítulo 1). As fêmeas destas espécies apresentam cuidado maternal na forma de construção e aprovisionamento dos ninhos, onde os imaturos se desenvolvem até o estágio adulto. Os membros do subgênero *Trypargilum* freqüentemente utilizam cavidades preexistentes para nidificarem, dividindo-as em séries lineares de células separadas por paredes de barro (Coville 1982). Os machos deste subgênero apresentam comportamento de guarda, o que pode ser interpretado como uma forma de cuidado parental, um traço raro entre os machos de Hymenoptera.

**Área de estudo.** Este estudo foi conduzido em duas áreas localizadas no estado de São Paulo: o *campus* da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) situado em Araras (22°18'S, 47°22'O, 629 m) e a Fazenda Rio Branco, localizada em Rifaina (20°04'S, 47°25'O, 575 m). Estas áreas apresentam clima do tipo Cwa (classificação de Koeppen), caracterizado por duas estações bem definidas: uma quente e chuvosa (Novembro - Março), com precipitação elevada e temperatura média acima de 22°C, e outra fria e seca (Abril-Outubro), com baixa precipitação e temperatura média abaixo de 18°C. Coletas mensais foram realizadas em Araras entre Dezembro de 2003 e Março 2007, resultando em 30 coletas (17 na estação quente-úmida e 13 na fria-seca). Em Rifaina, a periodicidade de amostragem alternou entre mensal ou bimestral, sendo realizada durante Novembro de 2004 a Março de 2007, totalizando 21 coletas (10 na estação quente-úmida e 11 na fria-seca).

**Amostragem.** As espécies foram amostradas por meio de ninhos-armadilha feitos com bambus secos seccionados entre cada nó. Os bambus apresentavam vários comprimentos (100 a 652 mm) e diâmetros internos (4,0 a 18,0 mm) e foram agrupados em 8 a 12 unidades de dimensões similares e distribuídos nas áreas de estudo.

Todos os ninhos-armadilha usados pelas vespas foram substituídos por novos e transportados para o Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), onde foram abertos. Quando os ninhos apresentavam indivíduos em fase de ovo ou larva, eram fechados novamente até que estes atingissem o estágio de pupa. Os pupários foram colocados individualmente em frascos de vidro, identificados com o número do ninho e com a posição em que se encontravam no ninho e mantidos à temperatura ambiente até a emergência do adulto, momento em que as espécies eram identificadas.

**Dados coletados.** Os comprimentos e diâmetros dos ninhos-armadilha utilizados pelas espécies de *Trypoxylon* foram tomados. Como a construção dos ninhos não foi monitorada, cada progênie foi tratada como um dado independente. A fecundidade de cada fêmea fundadora foi considerada como o número total de células produzidas em um ninho que apresentasse parede de fechamento. A data de emergência, o sexo e o peso (precisão de  $\pm 1$  mg) dos adultos foram anotados. Como estimativa do tamanho de corpo, além do peso, alguns indivíduos tiveram quatro características da asa direita mensuradas (mm): comprimento da asa anterior (CAA), largura da asa anterior (LAA), comprimento da asa posterior (CAP) e largura da asa posterior (LAP) (Figura 1). As medidas dos caracteres foram tomadas sob lupa, utilizando-se o sistema de captura de imagem Win TV 2000 e o programa computacional LEICA IM 50. Cada medida foi realizada cinco vezes, sendo utilizada a média destas para análises.

**Análises estatísticas.** As análises estatísticas foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos por Zar (1999), usando o programa Statistica para Windows (Release 7.0; Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma) e com nível de significância igual a 5%. Média ( $\bar{X}$ ) Desvio/Erro Padrão ( $\pm$ ) foram apresentados quando apropriado. Os dados foram testados para normalidade usando teste Shapiro-Wilcoxon (teste  $W$ ) ou D'Agostino (d), para amostras maiores que 50.

O dimorfismo sexual para tamanho de corpo foi expresso pela razão do valor médio de cada característica nas fêmeas sobre o valor médio do traço nos machos. O coeficiente de variação foi estimado para cada caráter estudado.

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar: i) os valores de diâmetro e comprimento dos ninhos das espécies de *Trypoxylon* coletadas em diferentes regiões e ii) comparar dados obtidos nas estações de coleta de diferentes anos. Cada ano de coleta foi dividido em duas estações (quente-úmida; fria-seca).

Correlação de Pearson ( $r$ ) foi utilizada para verificar associação entre i) o número de células e o comprimento do ninho e ii) as características de tamanho de corpo. Correlação entre os valores médios de peso de cada sexo entre os indivíduos do mesmo ninho foi estimada.

Teste  $t$  foi utilizado para: i) comparar a fertilidade média das fêmeas nas duas estações e ii) comparar os valores médios das características de tamanho de corpo entre machos e fêmeas das espécies de *Trypoxylon* e entre indivíduos produzidos nas duas estações (quente-úmida e fria-seca) do ano.

A razão sexual foi determinada com base nos indivíduos que emergiram em laboratório (razão sexual secundária) em cada uma das populações amostradas nas duas estações de coleta de cada ano. Teste de  $\chi^2$  foi utilizado para determinar a razão sexual secundária esperada de 1:1. Ninhos com parede de fechamento e nos quais todos os indivíduos emergiram foram utilizados para verificar, por regressão linear, o efeito do diâmetro do tubo e do número de células por ninho sobre a razão sexual (em porcentagem de machos arco-seno transformada).

O intervalo (em dias) de emergência entre machos e fêmeas de um mesmo ninho foi estimado a partir da diferença entre a data de emergência do primeiro macho com a da primeira fêmea. Desta forma, valores nulos representam emergência simultânea, valores negativos, emergência anterior do macho e valores positivos, emergência anterior da fêmea.

A herdabilidade para peso foi estimada separadamente para machos e fêmeas de cada espécie, provenientes de Araras e Rifaina, utilizando os coeficientes de correlação intra-classe entre os indivíduos do mesmo ninho (Falconer 1989). Neste método, a herdabilidade no sentido estrito,  $h^2$ , é estimada como  $t/r$ , onde  $t$  é a correlação intraclasse e  $r$  é a média do parentesco entre os indivíduos. A correlação intraclasse foi calculada a partir da ANOVA em ninhos (no mínimo, dois indivíduos do mesmo sexo por ninho) e o erro padrão da herdabilidade foi calculado usando a fórmula de Oldroyd e Moran (1983).

#### 4.4.3 Resultados

**Abundância sazonal e Arquitetura Intranidal.** Foram amostrados 1.214 ninhos das quatro espécies de *Trypargilum* (Tabela I). Estes ninhos foram coletados ao longo de todo o ano, mas principalmente na estação quente-úmida, período em que também ocorreu maior produção de células para a maioria das espécies (Tabela I).

As espécies de *Trypoxylon* utilizaram ninhos-armadilha de variadas dimensões para nidificar (Tabela I). Não houve diferença significativa entre o comprimento e o diâmetro dos tubos utilizados por *T. rogenhoferi* coletados nas duas áreas ( $F_1 = 0,30$  e  $F_1 = 1,69$ , respectivamente, NS) nem para *T. aurifrons* ( $F_1 = 0,61$  e  $F_1 = 0,08$ , respectivamente, NS), razão pela qual os dados foram agrupados. O número de células por ninho apresentou distribuição normal nas quatro espécies. Considerando ninhos completos (presença de parede de fechamento), foi verificada correlação entre o número de células e o comprimento do ninho-armadilha em *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse* (Tabela I).

**Dimorfismo sexual.** Os caracteres de tamanho de corpo apresentaram distribuição normal em machos e fêmeas das quatro espécies. Nessas espécies de *Trypoxylon*, dimorfismo sexual para tamanho de corpo foi evidenciado nas cinco características estudadas, sendo o peso dos adultos ao emergir o traço em que as maiores diferenças foram observadas (Tabela II). Para todas as características, as fêmeas foram significativamente maiores que os machos (Tabela II), e apresentaram menor variação para estas características (Tabela III).

Nas quatro espécies, correlação significativa foi verificada entre os cinco caracteres, sendo altos valores encontrados entre todas as medidas de asas de ambos os sexos (Tabela IV). Apenas em machos de *T. lactitarse* não foi verificada significância na correlação entre LAP e peso.

**Razão e Investimento Sexual.** A razão sexual secundária total em Araras diferiu significativamente da proporção 1:1 apenas em *T. nitidum*, sendo 1,31 fêmea para 1 macho. Em Rifaina, em *T. rogenhoferi* a proporção foi de 1 fêmea para 1,36 machos e em *T. aurifrons*, 1 fêmea para 1,38 machos, valores estatisticamente diferentes de 1:1 (Tabela V).

Considerando o peso ao emergir, o investimento relativo em fêmeas e machos de *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* provenientes de Araras foi de 1,27:1; 1,29:1; 1,68:1 e 1,76:1, respectivamente, o que difere de 1:1. Em Rifaina, o investimento em machos de *T. rogenhoferi* foi de 51% e 42% em *T. aurifrons* (ou 1:1,04 e 1,39:1, respectivamente, o que difere de 1:1) (Tabela VI).

Para as quatro espécies verificou-se uma tendência de que em ninhos-armadilha de menor diâmetro foi produzido maior número de machos (Figura 2). Entretanto, o efeito do diâmetro da cavidade sobre a razão sexual não foi confirmado por regressão linear nos ninhos de *T. rogenhoferi* e *T. aurifrons* em que todos os indivíduos emergiram (Figuras 3a e 3c).

Considerando ninhos completos, progênie composta exclusivamente de macho foi encontrada em nove ninhos de *T. rogenhoferi*, cinco de *T. aurifrons* e dois ninhos de *T. nitidum*. Observou-se ainda que a razão sexual está relacionada significativamente com o número de células do ninho (Figuras 3b e 3d).

**Fecundidade e alocação sazonal de recursos.** Em Araras, a fecundidade média das fêmeas de cada espécie de *Trypoxylon* provenientes das duas estações não foi significativamente diferente nos diferentes anos (ANOVA;  $P > 0,05$ ). Para as espécies provenientes de Rifaina, os dados indicam que as fêmeas da estação fria-seca foram mais produtivas que as da estação quente-úmida (Tabela VI).

Considerando a razão sexual secundária de cada espécie e as diferentes épocas de coleta em cada localidade, em poucas situações foi verificado desvio significativo da proporção 1:1 (Tabela V). Em Araras, estes desvios foram principalmente encontrados em *T. lactitarse*, com um viés para a produção de fêmea, enquanto que em Rifaina, maior produção de machos de *T. rogenhoferi* foi registrada em apenas duas estações (Tabela V).

Durante todo o período de amostragem, as fêmeas das espécies de *Trypoxylon* foram significativamente maiores que os machos e o peso de machos e fêmeas ao longo das estações apresentou um padrão similar de variação (Figura 4). De maneira geral, os indivíduos produzidos na estação quente-úmida foram significativamente maiores que os produzidos na estação fria-seca (Tabela V). Entretanto, os adultos de *T. rogenhoferi* coletados na estação fria-seca de Rifaina foram significativamente maiores que os produzidos na estação quente-úmida (Tabela V).

**Seqüência de oviposição e Intervalo de emergência.** Considerando todos os indivíduos das quatro espécies de *Trypoxylon* emergidos nas duas localidades, foi verificado que há uma tendência em se produzir machos nas primeiras células de cria (a partir de ninhos em que era conhecida a ordem de construção) (Tabela VIII).

Nas quatro espécies de *Trypoxylon* foi verificado que na maioria dos ninhos, o primeiro macho e a primeira fêmea emergiram no mesmo dia (Figura 5). Desvios de um a três dias foram observados, tanto para a emergência posterior de machos, quanto de fêmeas. Os

maiores valores foram encontrados em poucos ninhos da estação fria-seca, sendo de -27 a 114 dias em *T. rogenhoferi*, de -94 a 158 em *T. lactitarse*, de -18 a 21 dias em *T. aurifrons* e de -18 a 18 dias em *T. nitidum*.

Estes resultados indicam que ocorre uma diminuição do ritmo de desenvolvimento em poucos indivíduos de *T. rogenhoferi* e em *T. lactitarse*, dado o intervalo entre a emergência de indivíduos do mesmo ninho (maior que 30 dias), enquanto que em *T. aurifrons* e *T. nitidum*, o período inferior a 30 dias pode ser justificado pelo tempo gasto na construção do ninho.

**Herdabilidade e Seleção para tamanho de corpo.** Correlações significativas entre o peso médio de machos e fêmeas do mesmo ninho foram encontradas para todas as espécies (Figura 6). Os valores de herdabilidade estimados para as fêmeas das espécies de *Trypoxylon* foram menores que os estimados para machos, exceto para *T. aurifrons* proveniente de Rifaina (Tabela VIII).

A partir de ninhos completos, provenientes das duas localidades e das diferentes épocas de coleta, foi verificado que indivíduos que emergiram em ninhos com maior número de células apresentaram maior peso médio, independente de sexo (Tabela IX). Esta diferença foi significativa em machos e fêmeas de *T. rogenhoferi* e fêmeas de *T. aurifrons* e *T. nitidum* (Tabela IX).

#### 4.4.4 Discussão

**Estimativas de tamanho de corpo e Dimorfismo sexual.** No presente estudo, cinco caracteres foram utilizados para estimar o tamanho de corpo, dentre eles, peso e caracteres lineares (medidas de asa). De acordo com Coville e Griswold (1983), o comprimento da asa anterior é um bom indicador da quantidade de alimento recebida pelo imaturo. Como esta medida demonstrou estar significativamente correlacionada com o peso do adulto das quatro espécies estudadas, foi utilizada como único parâmetro nas análises de investimento parental.

Muitas espécies de aculeados constroem ninhos e as fêmeas aprovisionam o alimento para a progênie de forma massal. Em razão de que o tamanho do corpo do adulto é dependente da quantidade de recursos alocada para a cria (Klostermeyer *et al.* 1973; Freeman 1981; Johnson 1988; Bosch e Vicens 2005; Peruquetti e Del Lama 2003a) e que há baixa herdabilidade para características de tamanho de corpo (Tepedino *et al.* 1984), o peso do

adulto (total ou seco) e caracteres lineares de tamanho de corpo (comprimento e largura de asa, tórax e tíbia) são amplamente utilizados em estudos de investimento parental como preditores dos custos envolvidos na produção da progênie (Bosch e Vicens 2005; Danforth 1990).

No entanto, o uso dos valores de peso é questionável, uma vez que machos e fêmeas de himenópteros apresentam taxas de conversão metabólica diferentes (Boosma e Isaaks 1985; Trivers e Hare 1976). Danforth (1990) sugere que outras medidas, como o tempo de forrageamento, sejam também utilizadas; caso contrário, o investimento sexual em fêmeas pode ser superestimado (Danforth 1990; Bosh e Vicens 2005; Brockmann e Grafen 1992; Strohm e Linsenmair 2000). Brockmann e Grafen (1992) verificaram que em *Trypoxylon politum* o melhor estimador de alocação parental foi o peso total de provisão. Porém, a dificuldade de se obter estas informações em *Trypoxylon* faz com que a maioria dos estudos utilize principalmente o peso como medida de tamanho de corpo (Buschini 2007; Buschini *et al.* 2006; Buschini e Wolff 2006; Peruquetti e Del Lama 2003a), ou outros caracteres acessíveis. Em *T. rogenhoferi*, por exemplo, o caráter utilizado foi o comprimento de asa anterior por Peruquetti e Del Lama (2003a).

Ao estimar o custo da produção de cada sexo pelas espécies de *Trypoxylon* aqui estudadas, machos foram significativamente menores que fêmeas. Este dimorfismo foi verificado para as cinco características e apresentou valores significativos para todas as espécies. Dimorfismo sexual é comum entre os himenópteros solitários, sendo que, na maioria dos casos, a fêmea é o sexo de maior tamanho (Stubblefield e Seger 1994). Como já observado entre as espécies de *Trypoxylon*, mais recursos são dirigidos para a produção das fêmeas (Brockmann 1992; Garcia e Adis 1995; Molumby 1997; Camillo e Brescovit 1999; Peruquetti e Del Lama 2003a; Buschini e Wolff 2006). Este resultado pode significar um investimento adaptativo por parte da fêmea fundadora (Molumby 1997).

**Investimento sexual em *Trypoxylon*.** Em populações panmíticas, a seleção natural faz com que os parentais invistam igualmente em ambos os sexos, conduzindo a uma razão sexual uniforme (Trivers e Willard 1973). Uma situação que favorece desvios nesta razão é a presença de dimorfismo sexual para tamanho de corpo. Neste caso, a teoria de Fisher (1958) sobre alocação sexual prediz que o investimento parental estará distribuído igualmente entre a progênie masculina e feminina. Mais recursos serão investidos no sexo de maior tamanho, mas haverá maior produção do sexo menos custoso. Assim, embora a razão

sexual numérica seja enviesada, a razão sexual de investimento (Visscher e Danforth 1993) será a mesma.

A razão sexual em espécies de *Trypoxylon* é variável espacial e temporalmente (Buschini 2007; Coville e Colville 1980; Camillo *et al* 1993,1994; Garcia e Adis 1995; Peruquetti e Del Lama 2003a), resultado também observado neste estudo. Variações sazonais de oferta de recursos para forrageamento podem causar desvios na razão sexual de muitos himenópteros, sendo que os machos (sexo menos custoso) são produzidos preferencialmente quando o sucesso de forrageamento é baixo (Brockmann e Grafen 1992; Charnov 1982; Strohm e Linsenmair 1997; West e Sheldon 2002). Além das flutuações sazonais, outros fatores podem contribuir para os desvios da razão sexual 1:1 nos himenópteros. Em espécies de *Trypoxylon*, alguns autores sustentam que características dos ninhos-armadilha apresentam grande influência sobre a razão sexual. Krombein (1967), Coville e Coville (1980), Oku e Nishida (1999), Peruquetti e Del Lama (2003a) e Buschini (2007) observaram maior produção de machos em cavidades de diâmetro reduzido. Neste estudo, maior número de machos foi observado em tubos de menor diâmetro, mas este efeito do diâmetro da cavidade sobre a razão sexual secundária não foi confirmada por regressão linear.

Características da história-de-vida também podem influenciar a razão sexual, como a taxa diferencial de mortalidade entre os sexos. Além disso, o fato da distribuição dos sexos não ser randômica para a maioria das espécies de *Trypoxylon* (Coville e Coville 1980; Camillo *et al.* 1993; Camillo *et al.* 1994), sendo as fêmeas produzidas nas últimas células, pode causar desvios na razão sexual, uma vez que o parasitismo por Chrysididae, Ichneumonidae e Sarcophagidae é principalmente encontrado nestas células (Camillo *et al.* 1993). A pressão de parasitas também pode afetar a qualidade da prole: baixa pressão permite que as células de cria permaneçam mais tempo abertas e possam ser melhor provisionadas pelas fêmeas (Brockmann 1992). Neste trabalho foi considerada a razão sexual secundária, ou seja, a partir de indivíduos emergidos e diferenças poderiam surgir se considerada a razão sexual primária. Entretanto, o principal parasitóide destas espécies de *Trypoxylon* foi *Melittobia* e, na sua presença, a maior parte das células de um ninho era comprometida (Capítulo 1). Parasitismo por vespas e moscas parasitóides, que podem gerar algum desvio da razão sexual, foi baixo (Capítulo 1), indicando que a razão sexual pode não ter sido influenciada por este fator.

Em Araras, o investimento em fêmeas (considerando peso ao emergir) das quatro espécies de *Trypoxylon* foi maior que nos machos e não foi observado viés da razão

sexual para o sexo menos custoso. Desta forma, a razão sexual de investimento não foi igualitária. Desvios deste tipo podem ser atribuídos a: i) competição local por acasalamento (Hamilton 1967; Cowan 1991), ii) endogamia (Herre 1987), iii) sobreposição de geração (Werren e Charnov 1978; Seger 1983; Brockmann e Grafen 1992) e, iv) aumento local de recurso (Schwarz 1988; Martins *et al.* 1999).

Em *Trypoxylon malaisei*, o maior investimento na produção de fêmeas foi explicado pela primeira hipótese alternativa: competição local por acasalamento (Oku e Nishida 1999). Os autores observaram que tanto a razão sexual primária quanto a secundária foi enviesada para fêmeas. Pelo fato de que na maioria dos ninhos os machos são produzidos nas últimas células e emergem mais cedo que as fêmeas, acasalamento entre irmãos é facilitado: machos já estarão presentes na população quando as fêmeas emergirem, possibilitando a elas acasalarem-se com seus próprios irmãos, principalmente se estes estiverem próximos ao ninho natal. Nesta situação, a fêmea fundadora diminui a competição entre seus filhos, aumentando o número de filhas (Taylor 1981). No entanto, esta alternativa não se aplica aos resultados encontrados neste estudo, uma vez que não há indícios de endogamia acentuada.

Em *T. politum* e outras espécies de vespas, a razão sexual enviesada para fêmeas foi explicada pelo modelo de sobreposição de gerações (Werren e Charnov 1978; Seger 1983; Brockmann e Grafen 1992). Neste modelo, espécies parcialmente bivoltinas apresentam machos que sobrevivem a uma geração e copulam com as fêmeas da próxima geração. Dessa maneira, a primeira geração deve ser enviesada para machos e a segunda, deve ser 1:1 ou enviesada para fêmeas. Esta teoria é aplicada para espécies bivoltinas e não tem sido postulada para espécies tropicais e multivoltinas (Buschini 2007). Este modelo, portanto, não pode ser aplicado aos dados do presente estudo. Neste trabalho, foi verificada em *T. rogenhoferi* e em *T. lactitarse* provável diapausa na estação fria-seca e, portanto, os indivíduos produzidos em uma geração sobreviveram até a próxima. No entanto, esta pausa no desenvolvimento foi observada para uma pequena fração da população de ambos os sexos, não tendo influência na razão sexual temporal.

Peruquetti (2003) sugeriu que em *T. rogenhoferi* a hipótese sobre o aumento local de recursos pode ser uma explicação possível para o viés observado na produção de fêmeas. O fato de oferecer ninhos de diâmetros variados possibilitou que a fêmea fundadora escolhesse o diâmetro adequado de acordo com a oferta: em situações de farta disponibilidade de aranhas, uma maior produção de fêmeas seria encontrada. O aumento local de recurso tem

sido uma importante alternativa para explicar a alocação sexual enviesada para fêmeas em algumas espécies de abelhas (Martins *et al.* 1999; Schwarz 1988; Stark 1992). Desta forma, esta hipótese também poderia ser uma explicação alternativa para os desvios de investimento sexual nas espécies de *Trypoxylon* provenientes de Araras.

Diferentemente, em Rifaina a razão sexual foi desviada para a produção de machos. Em *T. aurifrons* este desvio “compensou” o investimento maior em fêmeas, sendo que para esta espécie a razão sexual de investimento está de acordo com o esperado por Fisher (1958). Entretanto, a razão de investimento em *T. rogenhoferi* foi maior em machos. Este resultado pode ser explicado por i) fêmeas não acasaladas e ii) competição local por recurso (Clark 1978; Visscher e Danforth 1993). Aparentemente, i) não se aplica a esta população, já que o número de ninhos com prole exclusiva de machos foi baixo. Desta forma, a hipótese de competição local por recursos (Clark 1978; Visscher e Danforth 1993) pode ser uma explicação plausível. Este modelo prediz que machos, sendo o sexo menos custoso, são produzidos preferencialmente quando o sucesso de forrageamento é baixo (Brockmann e Grafen 1992; Charnov 1982).

**Fecundidade e Alocação sazonal.** Em himenópteros solitários, a fêmea investe grande parte de sua energia na reprodução em atividades como a obtenção de alimento, construção de ninho e síntese das reservas nutritivas do ovo, a fim de aumentar o valor reprodutivo da progênie. Custos para adquirir estes recursos podem variar sazonalmente com a mudança de ambiente e, assim, afetar a taxa de provisionamento destes insetos (Parker e Frohlich 1985). Como consequência, o tamanho de corpo da prole pode variar em resposta a variações sazonais de fatores ecológicos.

Maior produção de ninhos e células na estação quente-úmida foi relatada em espécies de *Trypoxylon* neotropicais, como *Trypoxylon lactitarse* (Camillo *et al.* 1993; Camillo e Brescovit 1999; Buschini *et al.* 2006), *T. rogenhoferi* (Camillo *et al.* 1994; Garcia e Adis 1995), *Trypoxylon aestivale* (Camillo 1999), *Trypoxylon antropovi* (Camillo 1999), *Trypoxylon opacum* (Buschini e Wolff 2006) e *T. aurifrons* (Santoni e Del Lama 2007). O presente estudo verificou igualmente que as espécies de *Trypoxylon* estão presentes durante todo o ano; no entanto, apresentam maior atividade entre novembro e março.

Para as espécies coletadas em Araras, houve uma maior atividade de nidificação na estação quente-úmida. As fêmeas fundadoras apresentaram fecundidades semelhantes nas duas estações e mantiveram a mesma razão sexual ao longo do período. A estratégia de produção sazonal adotada por estas fêmeas foi produzir progênie de menor

tamanho na estação fria-seca, quando os recursos de provisionamento são escassos e, indivíduos maiores na estação quente-úmida, na qual os recursos são abundantes. Além disso, em todas as estações, fêmeas foram significativamente maiores que os machos.

Em Rifaina, as duas espécies coletadas apresentaram maior fecundidade na estação fria-seca. Em *T. aurifrons*, progênie feminina maior foi encontrada na estação quente-úmida, mas em *T. rogenhoferi* resultado oposto foi registrado. Para *T. rogenhoferi*, o padrão sazonal de investimento pode ser interpretado como uma correlação positiva entre o tamanho da fêmea e a taxa de provisionamento na estação fria-seca: fêmeas maiores estariam produzindo progênie de maior número e de maior tamanho. No entanto, vale ressaltar que Rifaina teve uma amostragem maior na estação fria-seca e esta diferença pode causar algum desvio nos resultados, gerando interpretações equivocadas.

Alguns modelos explicam a variação no padrão de investimento sazonal em que não são esperados desvios na razão sexual, mas a produção de um menor número de indivíduos de menor tamanho é requerida. Rosenheim *et al.* (1996) apontam que na estação menos favorável, quando o recurso é escasso, as fêmeas investem em uma progênie de menor tamanho. No entanto, é o custo relativo dos sexos que determina o investimento ótimo e não o custo absoluto, ou seja, se fêmeas são duas vezes maiores que machos, e então necessitam do dobro da quantidade de provisionamento, os custos relativos de ambos os sexos não irão mudar devido à diminuição de recursos. Neste modelo, não importa a disponibilidade de provisão; se o sucesso reprodutivo é maior quando há produção de filhas, mesmo que elas necessitem duas vezes mais investimento, a fêmea fundadora alocará mais recursos neste sexo para garantir sua vantagem adaptativa. Esta hipótese foi aplicada para explicar os resultados obtidos em abelhas escavadoras do gênero *Amegilla* (Alcock 1996; Alcock *et al.* 2005) e pode ser aplicada aos resultados deste estudo para as espécies de *Trypoxylon*.

**Seleção para tamanho de corpo.** Em trabalhos com espécies de *Trypoxylon* é verificado que fêmeas são maiores que os machos (Brockmann 1992; Buschini 2007; Buschini *et al.* 2006; Garcia e Adis 1995; Molumby 1997; Camillo 1999; Camillo e Brescovit 1999; Peruquetti e Del Lama 2003a). Molumby (1997) sugere que este dimorfismo é um traço adaptativo: fêmeas maiores têm maior vantagem adaptativa, pois coletam maior massa de aranhas por dia, caçam aranhas maiores e provisionam seus ninhos mais rapidamente. Do ponto de vista da seleção para tamanho de corpo, fêmeas que recebem maior provisão enquanto larvas seriam selecionadas favoravelmente em relação às que receberam menos provisão (Peruquetti e Del Lama 2003a).

No presente estudo, seleção para tamanho de corpo em fêmeas das espécies de *Trypoxylon* foi evidenciada pelos menores valores dos coeficientes de variação das características métricas consideradas. Além disso, foi verificado que fêmeas maiores produzem uma progênie mais numerosa e de maior tamanho de corpo, confirmando a hipótese proposta por Molumby (1997).

A associação entre valor adaptativo e tamanho de corpo foi detectada em espécies de vespas e abelhas com aprovisionamento massal (Alcock 1979; Cowan 1991; Strohm e Lisenmair 1997, 2000; Peruquetti e Del Lama 2003a). Nestes trabalhos, os autores verificaram taxas diferenciadas de forrageamento, caça, aprovisionamento e construção de células de cria. Ainda, Molumby (1997) sugere que características de tamanho do corpo sejam, mesmo que parcialmente, maternalmente herdadas.

Em himenópteros, a base genética de características quantitativas já foi extensivamente estudada em *Apis mellifera*; no entanto, poucos são os trabalhos que tratam de traços genéticos em outras espécies. Tepedino *et al.* (1984) encontraram baixa herdabilidade para tamanho de corpo (medido por peso) em *Osmia lignaria propinqua*, estimada por correlação intra-classe. Owen e McCorquodale (1994) verificaram valores de herdabilidade em *Megachile rotundata* estimada por correlação intra-classe menores que as estimadas por regressão linear.

Apesar dos valores de herdabilidade obtidos por correlação intra-classe superestimarem o efeito materno comum, foi verificado neste trabalho que os indivíduos de um ninho são mais similares entre si do que com indivíduos de ninhos diferentes. Estes resultados, associados à alta correlação entre machos e fêmeas de um mesmo ninho indicam que características de tamanho de corpo apresentam componentes genéticos em sua determinação. Em fêmeas, foram encontrados valores de herdabilidade menores que em machos, sugerindo maior pressão de seleção neste sexo (Falconer 1989). No entanto, os altos valores de herdabilidade em machos sugerem igualmente que estes também se beneficiam do maior tamanho de corpo.

Em machos, não foi detectada evidência de seleção para tamanho de corpo nos estudos já realizados (Molumby 1997; Peruquetti e Del Lama 2003a). Estes autores sugerem que estes resultados podem não ser consistentes, já que em outras espécies de himenópteros, machos maiores apresentaram maiores valores adaptativos (Alcock 1991; Strohm e Lechner 2000). Molumby (1997) sugere que o maior tamanho de corpo dos machos de *Trypargilum* poderia facilitar a guarda do ninho: o macho “ajudaria” a sua parceira a aprovisionar melhor

as células de cria, espantaria melhor seus opositores e inimigos naturais. Dessa forma, garantiria que prole feminina fosse produzida, beneficiando-se, portanto.

Neste estudo, foi confirmado que fêmeas das espécies de *Trypoxylon* são significativamente maiores que machos, sendo que um maior investimento de recursos é destinado a este sexo. Como proposto por Molumby (1997), significa um investimento adaptativo por parte da fêmea fundadora e este resultado foi evidenciado pela observação de que qualidade e quantidade da prole mostraram-se associadas. A alocação sazonal de investimento nestas espécies parece estar relacionada com um aumento local de recursos, de acordo com a teoria de Schwarz (1988). Novos estudos são necessários para confirmar os padrões de alocação sexual e o significado do dimorfismo sexual nestas e em outras espécies relacionadas.

**Tabela I.** Abundância sazonal e arquitetura de ninhos de espécies de *Trypoxylon* coletadas por ninhos-armadilha em duas áreas do estado de São Paulo. Os valores de correlação (r) entre o número de células por ninho e o comprimento são apresentados. A: amplitude de variação; QU: estação quente-úmida; FS: fria-seca.

	<i>T. rogenhoferi</i>	<i>T. lactitarse</i>	<i>T. aurifrons</i>	<i>T. nitidum</i>
Número de ninhos (número de células) – Araras – QU	123 (823)	96 (657)	101 (515)	121 (683)
Número de ninhos (número de células) – Araras – FS	86 (662)	31 (254)	17 (89)	19 (121)
Número de ninhos (número de células) – Rifaina – QU	246 (1498)		84 (398)	
Número de ninhos (número de células) – Rifaina – FS	249 (1650)		41 (262)	
Comprimento dos ninhos (cm)	A: 1,05-61,5 28,0±0,4	A: 8,6-44,0 21,3±0,4	A: 11,7-46,7 25,1±0,5	A: 5,1-19,2 24,1±0,5
Diâmetro dos ninhos (mm)	A: 5,1-19,2 9,0±0,1	A: 4,5-17,5 9,2±0,2	A: 3,1-16,6 6,7±0,1	A: 3,5-11,4 6,5±0,2
Número de células por ninho (ninhos completos)	7±3.0 (n = 475)	8±2.0 (n = 84)	5±2.0 (n = 197)	6±2.0 (n = 109)
r (Pearson)	0.34*	0.33*	0.02	0.01

\* P < 0.05

**Tabela II.** Média  $\pm$  erro padrão e dimorfismo sexual (DS) (dimorfismo sexual para tamanho de corpo foi expresso pela razão do valor médio de cada característica nas fêmeas sobre o valor médio do traço nos machos) de cinco caracteres morfológicos de machos e fêmeas de *Trypoxylon*. CAA – comprimento da asa anterior, LAA – largura da asa anterior, CAP – comprimento da asa posterior e LAP – largura da asa posterior. Valores de teste *t* comparando as características de machos e fêmeas são apresentados (n = número de observações)

Característica	<i>T. rogenhoferi</i>		<i>T. lactitarse</i>		<i>T. aurifrons</i>		<i>T. nitidum</i>	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Peso (mg)	78,44 $\pm$ 0,52	67,73 $\pm$ 0,45	72,75 $\pm$ 0,78	55,56 $\pm$ 0,74	32,74 $\pm$ 0,45	25,93 $\pm$ 0,54	26,95 $\pm$ 0,46	21,08 $\pm$ 0,43
(n)	(1066)	(1213)	(207)	(210)	(274)	(248)	(226)	(168)
DS		1,16		1,31		1,26		1,28
CAA (mm)	10,27 $\pm$ 0,15	7,76 $\pm$ 0,08	10,64 $\pm$ 0,06	9,85 $\pm$ 0,05	7,74 $\pm$ 0,05	7,24 $\pm$ 0,04	7,40 $\pm$ 0,04	6,64 $\pm$ 0,04
(n)	(77)	(23)	(37)	(43)	(108)	(82)	(90)	(76)
DS		1,32		1,08		1,07		1,11
LAA (mm)	3,33 $\pm$ 0,02	3,22 $\pm$ 0,05	3,13 $\pm$ 0,02	2,97 $\pm$ 0,01	2,31 $\pm$ 0,01	2,16 $\pm$ 0,01	2,15 $\pm$ 0,01	1,96 $\pm$ 0,01
DS		1,03		1,05		1,07		1,10
CAP (mm)	8,21 $\pm$ 0,06	7,81 $\pm$ 0,12	8,18 $\pm$ 0,05	7,48 $\pm$ 0,04	5,89 $\pm$ 0,04	5,48 $\pm$ 0,03	5,63 $\pm$ 0,03	5,00 $\pm$ 0,04
DS		1,05		1,09		1,07		1,12
LAP (mm)	2,37 $\pm$ 0,02*	2,33 $\pm$ 0,03*	2,24 $\pm$ 0,01	2,18 $\pm$ 0,01	1,71 $\pm$ 0,01	1,65 $\pm$ 0,01	1,60 $\pm$ 0,01	1,51 $\pm$ 0,01
DS		1,02		1,03		1,04		1,06

\*P > 0,05

**Tabela III.** Coeficiente de variação de cinco caracteres medidos em machos e fêmeas de espécies de *Trypoxylon*: peso, comprimento da asa anterior (CAA), largura da asa anterior (LAA), comprimento da asa posterior (CAP) e largura da asa posterior (LAP).

Traço	<i>T. rogenhoferi</i>		<i>T. lactitarse</i>		<i>T. aurifrons</i>		<i>T. nitidum</i>	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Peso (mg)	21,85	22,92	15,44	21,53	23,92	32,16	25,71	26,27
CAA (mm)	6,16	7,13	5,35	5,42	5,63	6,88	4,58	7,03
LAA (mm)	6,31	6,84	4,82	4,83	5,45	6,27	4,68	6,12
CAP (mm)	6,32	7,33	6,00	5,65	5,63	7,17	4,84	7,57
LAP (mm)	6,26	6,29	4,26	4,42	6,15	6,19	4,91	5,94

**Tabela IV.** Correlação de Pearson entre os cinco caracteres analisados: Peso (mg), CAA (mm) – comprimento da asa anterior, LAA (mm) – largura da asa anterior, CAP (mm) – comprimento da asa posterior e LAP (mm) – largura da asa posterior em quatro espécies de *Trypoxylon*.

	Fêmeas				Machos			
	Peso	CAA	LAA	CAP	Peso	CAA	LAA	CAP
<b><i>T. rogenhoferi</i></b>								
CAA	0,81				0,76			
LAA	0,75	0,95			0,79	0,97		
CAP	0,82	0,99	0,93		0,76	0,99	0,98	
LAP	0,74	0,92	0,93	0,90	0,83	0,93	0,93	0,92
<b><i>T. lactitarse</i></b>								
CAA	0,69				0,48			
LAA	0,68	0,91			0,33	0,83		
CAP	0,66	0,99	0,91		0,44	0,97	0,85	
LAP	0,65	0,85	0,91	0,83	0,27*	0,72	0,86	0,77
<b><i>T. aurifrons</i></b>								
CAA	0,62				0,70			
LAA	0,59	0,97			0,60	0,91		
CAP	0,62	0,98	0,90		0,68	0,98	0,90	
LAP	0,56	0,87	0,88	0,85	0,67	0,87	0,88	0,85
<b><i>T. nitidum</i></b>								
CAA	0,52				0,75			
LAA	0,49	0,92			0,74	0,96		
CAP	0,54	0,98	0,92		0,75	0,99	0,92	
LAP	0,43	0,85	0,89	0,83	0,72	0,93	0,96	0,93

\*P > 0,05

**Tabela V.** Razão sexual (fêmeas : machos) em espécies de *Trypoxylon* coletadas em duas áreas do estado de São Paulo em diferentes épocas de coleta. Os valores de  $\chi^2_1$  comparando a razão sexual observada (obs.) com a esperada de 1:1 são apresentados.

Área	Estação	Ano	<i>T. rogenhoferi</i>		<i>T. lactitarse</i>		<i>T. aurifrons</i>		<i>T. nitidum</i>	
			Obs.	$\chi^2_1$	Obs.	$\chi^2_1$	Obs.	$\chi^2_1$	Obs.	$\chi^2_1$
Araras	Quente-úmida	2003-2004	101:127	2,97	57:60	0,08	44:38	0,44	141:100	6,96*
		2004-2005	69:72	0,06	65:66	0,12	48:48	0,00	89:86	0,05
		2005-2006	45:45	0,00	31:38	0,71	31:10	10,76*	8:3	0,29
	Fria-seca	2006-2007	210:214	0,04	32:16	5,33*	4:4	0,00		
		2004	127:79	11,18*	29:12	7,05*	13:10	0,39	34:19	4,25
		2005	69:72	0,06	65:66	0,12	48:48	0,00	89:86	0,05
		2006	9:10	0,05	5:2	1,29	3:2	0,20	6:0	-
		626:624	0,00	249:249	0,00	150:117	4,08	284:216	9,25*	
Rifaina	Quente-úmida	2004-2005	227:329	18,71*			64:83	2,47		
		2005-2006	13:7	1,80						
		2006-2007	109:214	0,06			28:39	1,81		
		2005	196:212	0,63			15:25	0,81		
		2006	209:263	6,18*			13:18	1,16		
		754:1025	41,28*			120:165	7,11*			

\* P < 0,05

**Tabela VI.** Média  $\pm$  erro padrão da fecundidade das fêmeas fundadoras (número de células por ninho) e pesos (mg) de machos e fêmeas de quatro espécies de *Trypoxylon* emergidos em laboratório. As espécies foram coletadas em duas áreas do estado de São Paulo em duas estações: (QU: quente-úmida; FS: fria-seca). Teste *t* comparando as características de indivíduos produzidos nas estações.

Espécie/Estação	Araras			Rifaina		
	Fecundidade	Fêmea (mg)	Macho (mg)	Fecundidade	Fêmea (mg)	Macho (mg)
<b><i>T. rogenhoferi</i></b>	<b>7,9<math>\pm</math>0,26</b>	<b>83,63<math>\pm</math>0,95</b>	<b>74,52<math>\pm</math>0,88</b>	<b>7,1<math>\pm</math>0,16</b>	<b>75,97<math>\pm</math>0,60</b>	<b>64,96<math>\pm</math>0,49</b>
QU	7,3 $\pm$ 0,3 (n = 88)	82,46 $\pm$ 1,33 (n = 425)	75,11 $\pm$ 1,22 (n = 458)	6,6 $\pm$ 0,2 (n = 173)	71,87 $\pm$ 0,81 (n = 349)	62,15 $\pm$ 0,68 (n = 550)
FS	8,8 $\pm$ 0,4 (n = 55)	83,97 $\pm$ 1,44 (n = 201)	73,56 $\pm$ 1,21 (n = 166)	7,8 $\pm$ 0,2 (n = 159)	80,38 $\pm$ 0,89 (n = 405)	67,77 $\pm$ 0,70 (n = 475)
<i>t</i>	2,83	0,78	0,87	3,64*	7,08*	5,71*
<b><i>T. lactitarse</i></b>	<b>7,8<math>\pm</math>0,22</b>	<b>72,75<math>\pm</math>0,78</b>	<b>55,56<math>\pm</math>0,54</b>			
QU	7,7 $\pm$ 0,2 (n = 64)	74,11 $\pm$ 0,93 (n = 185)	56,80 $\pm$ 0,90 (n = 180)			
FS	8,3 $\pm$ 0,5 (n = 20)	68,90 $\pm$ 1,61 (n = 64)	51,92 $\pm$ 1,90 (n = 69)			
<i>t</i>	1,12	2,88*	2,87*			
<b><i>T. aurifrons</i></b>	<b>5,6<math>\pm</math>0,24</b>	<b>31,73<math>\pm</math>0,58</b>	<b>23,50<math>\pm</math>0,56</b>	<b>5,4<math>\pm</math>0,26</b>	<b>33,64<math>\pm</math>0,65</b>	<b>27,78<math>\pm</math>0,80</b>
QU	5,6 $\pm$ 0,3 (n = 73)	32,70 $\pm$ 0,55 (n = 127)	24,26 $\pm$ 0,58 (n = 100)	4,8 $\pm$ 0,3 (n = 75)	35,47 $\pm$ 0,91 (n = 92)	23,93 $\pm$ 0,60 (n = 122)
FS	5,4 $\pm$ 0,5 (n = 15)	25,95 $\pm$ 0,93 (n = 23)	19,71 $\pm$ 0,90 (n = 17)	6,7 $\pm$ 0,5 (n = 34)	32,10 $\pm$ 1,52 (n = 28)	25,57 $\pm$ 1,54 (n = 43)
<i>t</i>	0,34	4,33*	2,88*	3,70*	2,05*	0,27
<b><i>T. nitidum</i></b>	<b>6,3<math>\pm</math>0,24</b>	<b>26,95<math>\pm</math>0,46</b>	<b>21,07<math>\pm</math>0,43</b>			
QU	6,2 $\pm$ 0,3 (n = 94)	27,48 $\pm$ 0,61 (n = 238)	21,47 $\pm$ 0,57 (n = 189)			
FS	7,0 $\pm$ 0,6 (n = 15)	24,00 $\pm$ 0,95 (n = 46)	18,33 $\pm$ 0,87 (n = 27)			
<i>t</i>	1,19	2,74*	2,48*			

\*P < 0,05.

**Tabela VII.** Número de machos e fêmeas emergidos de cada célula de ninhos-armadilha de quatro espécies de *Trypoxylon*. As células são numeradas a partir da extremidade oposta à entrada do ninho.

Espécie	Célula														
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	15-17 <sup>a</sup>
<b><i>T. rogenhoferi</i></b>															
Macho	259	267	202	153	114	64	39	29	8	8	2	6	1		
Fêmea	35	67	103	122	124	137	106	86	75	80	34	16	10	3	4
<b><i>T. lactitarse</i></b>															
Macho	43	38	37	40	27	19	15	6	7	3				1	1
Fêmea	18	19	28	23	31	35	24	19	10	8	1	1	1		
<b><i>T. aurifrons</i></b>															
Macho	37	35	24	24	18	14	12	5	3	1					
Fêmea	25	32	40	28	30	10	9	2	5	2	1	1			
<b><i>T. nitidum</i></b>															
Macho	14	3	2	3	6	2	1	1	4						
Fêmea	2	9	9	9	6	3	2	1	2	1					

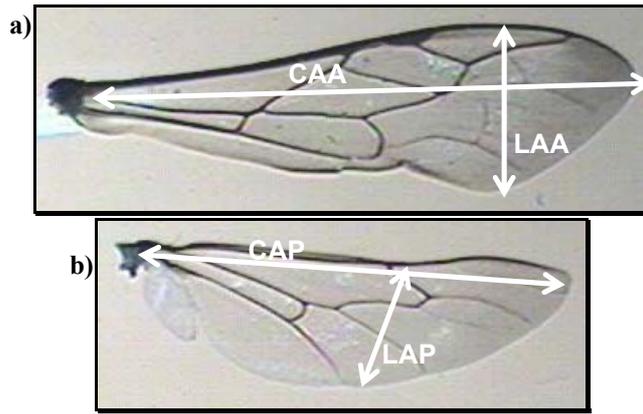
**Tabela VIII.** Herdabilidade  $\pm$  erro padrão para peso de machos e fêmeas de espécies de *Trypoxylon*.

Área	<i>T. rogenhoferi</i>		<i>T. lactitarse</i>		<i>T. aurifrons</i>		<i>T. nitidum</i>	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>Araras</b>								
n° ninhos	97	85	54	48	32	42	42	52
N° amostras	313	303	183	164	91	145	131	196
$h^2$	0,77 $\pm$ 0,1	0,59 $\pm$ 0,2	0,70 $\pm$ 0,1	0,43 $\pm$ 0,2	1,00 $\pm$ 0,1	0,70 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,1	0,72 $\pm$ 0,1
<b>Rifaina</b>								
n° ninhos	229	142			37	30		
N° amostras	712	426			106	85		
$h^2$	0,95 $\pm$ 0,1	0,75 $\pm$ 0,1			0,45 $\pm$ 0,1	0,82 $\pm$ 0,1		

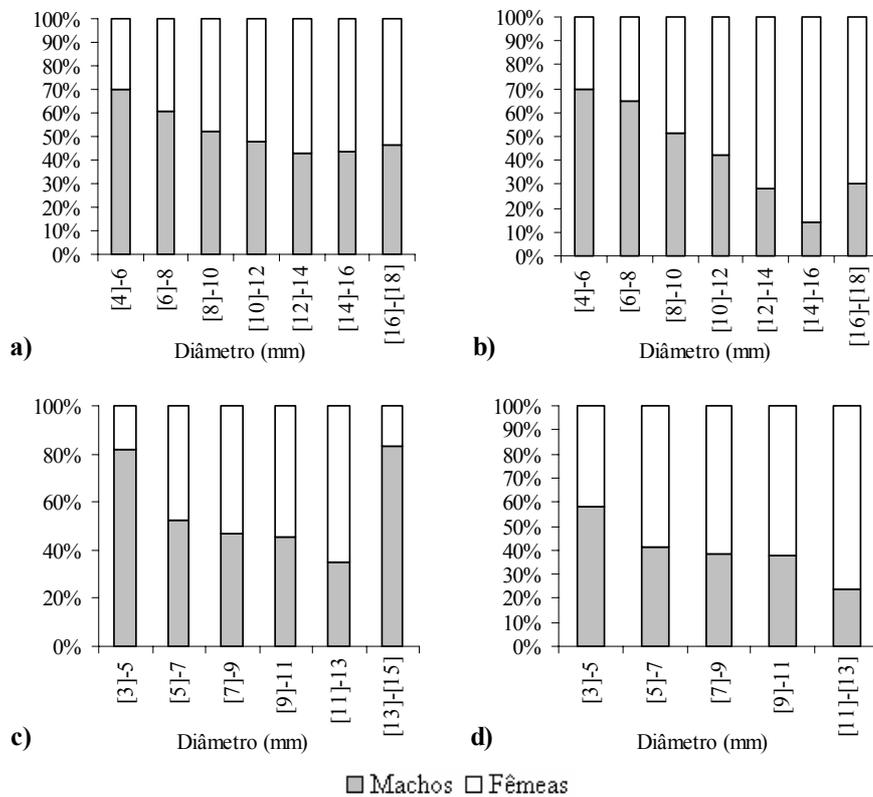
**Tabela IX.** Média  $\pm$  erro padrão de pesos de machos e fêmeas de espécies de *Trypoxylon* emergidos em ninhos com diferentes números de células. Os valores de *F* (ANOVA) são apresentados.

Espécie	N° células por ninho	Peso (mg)	
		Macho	Fêmea
<i>T. rogenhoferi</i>	1-4	62,55 $\pm$ 1,76	73,47 $\pm$ 1,91
	5-9	65,93 $\pm$ 0,68	75,88 $\pm$ 0,78
	10-14	71,43 $\pm$ 0,90	81,52 $\pm$ 0,88
	15-20	74,40 $\pm$ 5,05	93,04 $\pm$ 3,07
	<i>F</i>	11,89*	16,19*
<i>T. lactitarse</i>	1-4	52,68 $\pm$ 1,67	72,20 $\pm$ 9,82
	5-9	56,07 $\pm$ 0,84	72,91 $\pm$ 0,99
	10-14	58,53 $\pm$ 3,37	75,25 $\pm$ 2,06
	<i>F</i>	2,41	0,85
<i>T. aurifrons</i>	1-3	25,50 $\pm$ 0,85	31,60 $\pm$ 0,58
	4-6	25,80 $\pm$ 0,68	32,71 $\pm$ 0,65
	7-9	26,25 $\pm$ 1,28	33,81 $\pm$ 1,17
	10-14	26,34 $\pm$ 3,65	34,76 $\pm$ 1,41
	<i>F</i>	0,70	2,74*
<i>T. nitidum</i>	1-3	18,90 $\pm$ 1,82	21,30 $\pm$ 2,18
	4-6	18,98 $\pm$ 1,07	26,25 $\pm$ 0,95
	7-9	19,34 $\pm$ 0,76	25,47 $\pm$ 0,89
	10-13	20,84 $\pm$ 0,85	27,03 $\pm$ 1,39
	<i>F</i>	0,93	3,68*

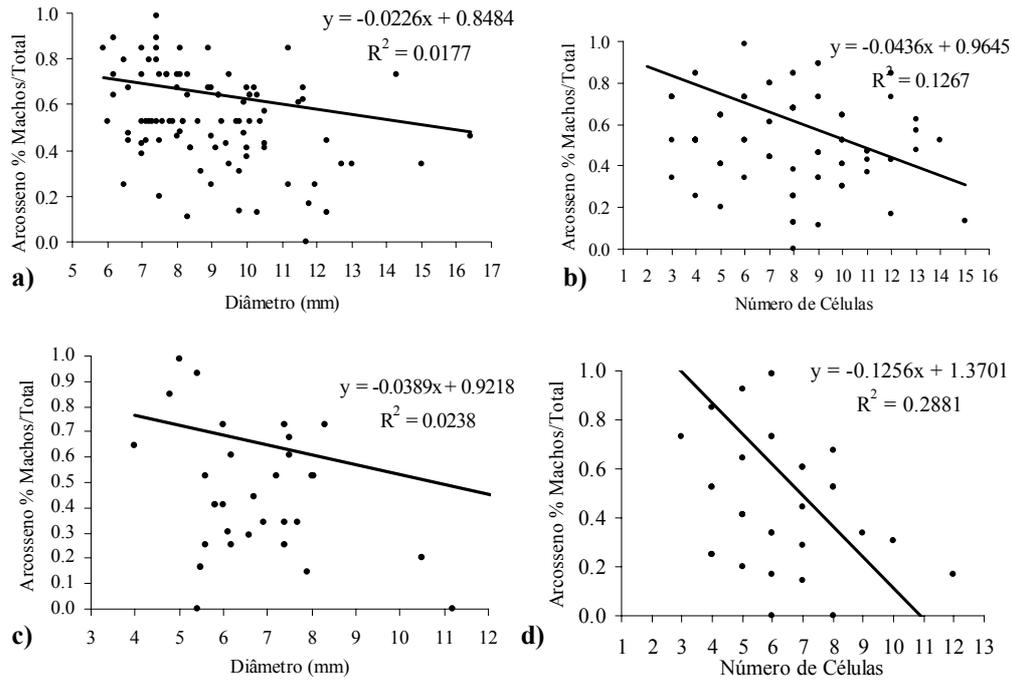
\*  $P < 0,05$



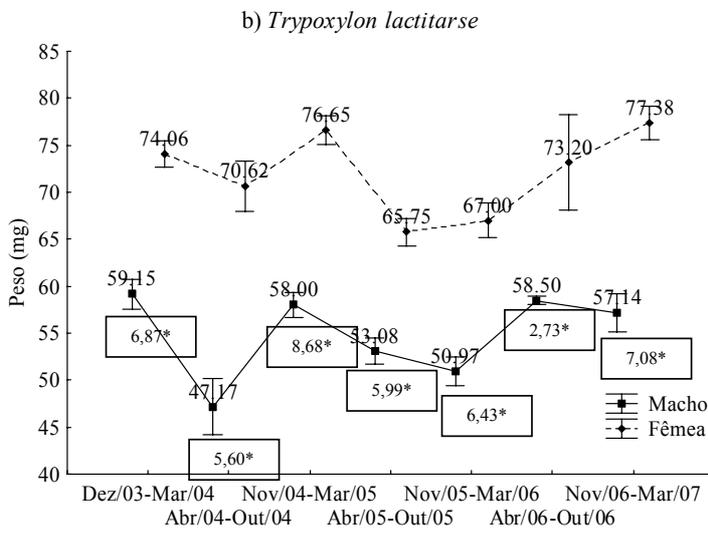
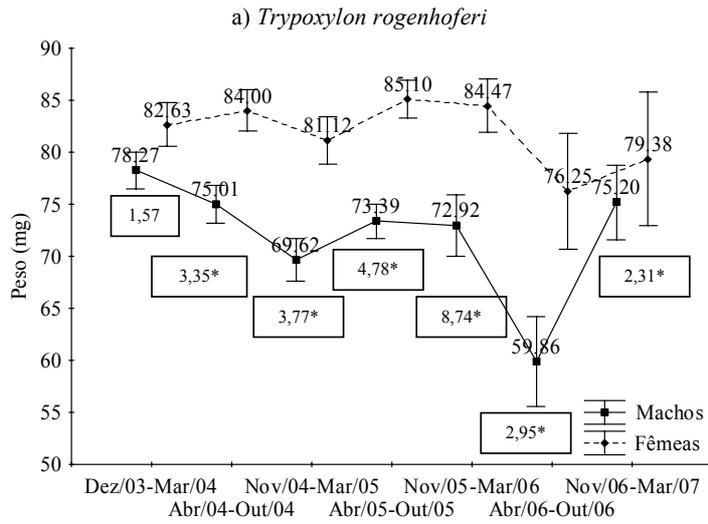
**Figura 1.** Asas direitas anterior (a) e posterior (b) de *Trypoxylon aurifrons* destacando os caracteres estudados. CAA: comprimento da asa anterior, LAA: largura da asa anterior, CAP: comprimento da asa posterior e LAP: largura da asa posterior.

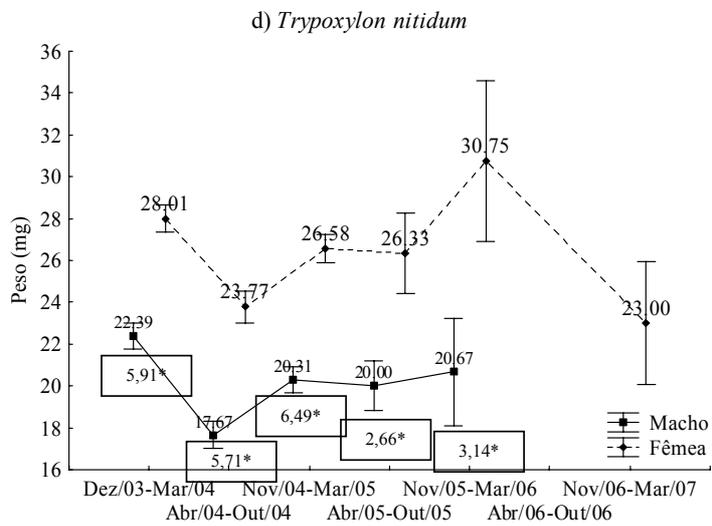
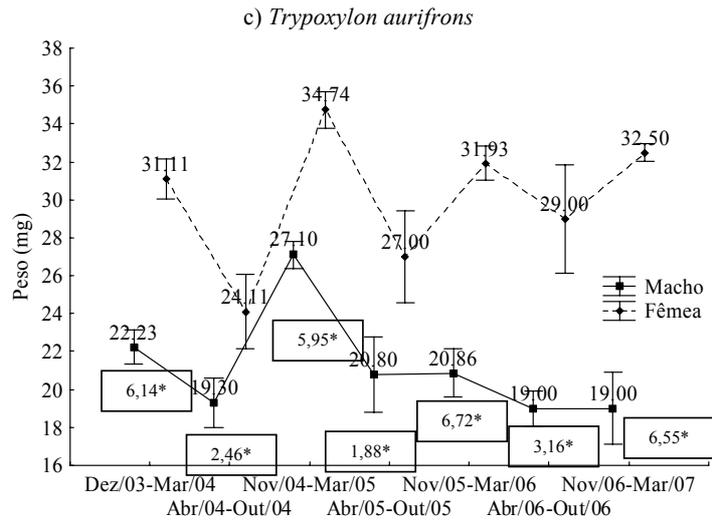


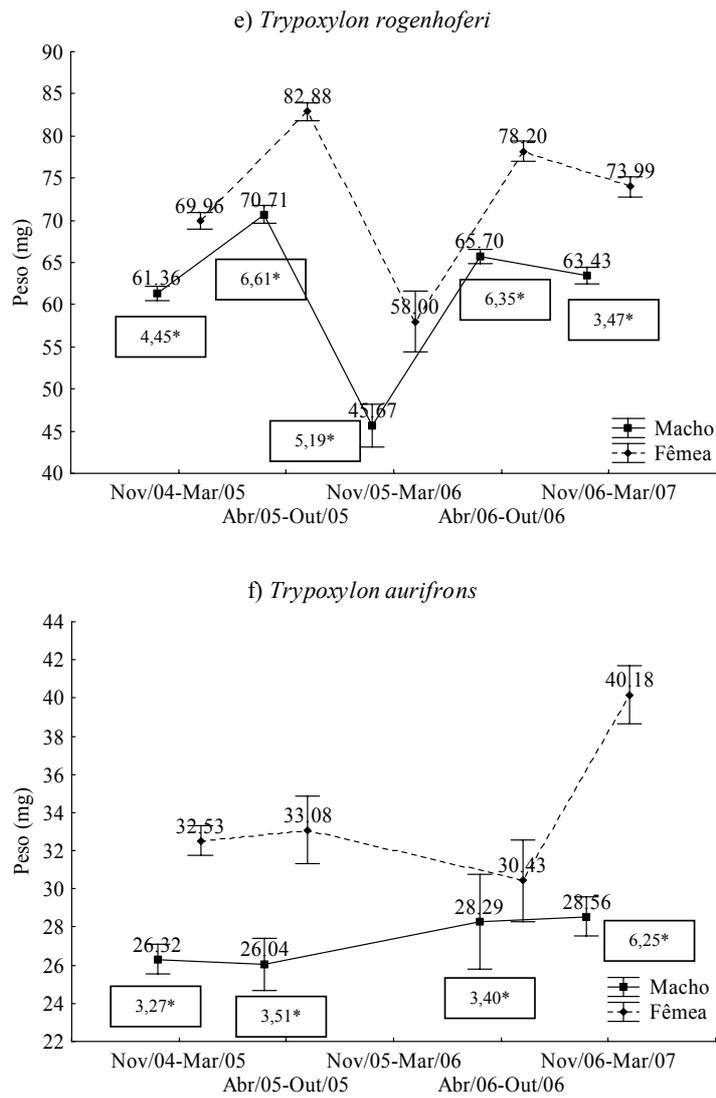
**Figura 2.** Proporção de machos e fêmeas de a) *Trypoxylon rogenhoferi*; b) *Trypoxylon lactitarse*; c) *Trypoxylon aurifrons*; d) *Trypoxylon nitidum* em cada classe de diâmetro do ninho (mm).



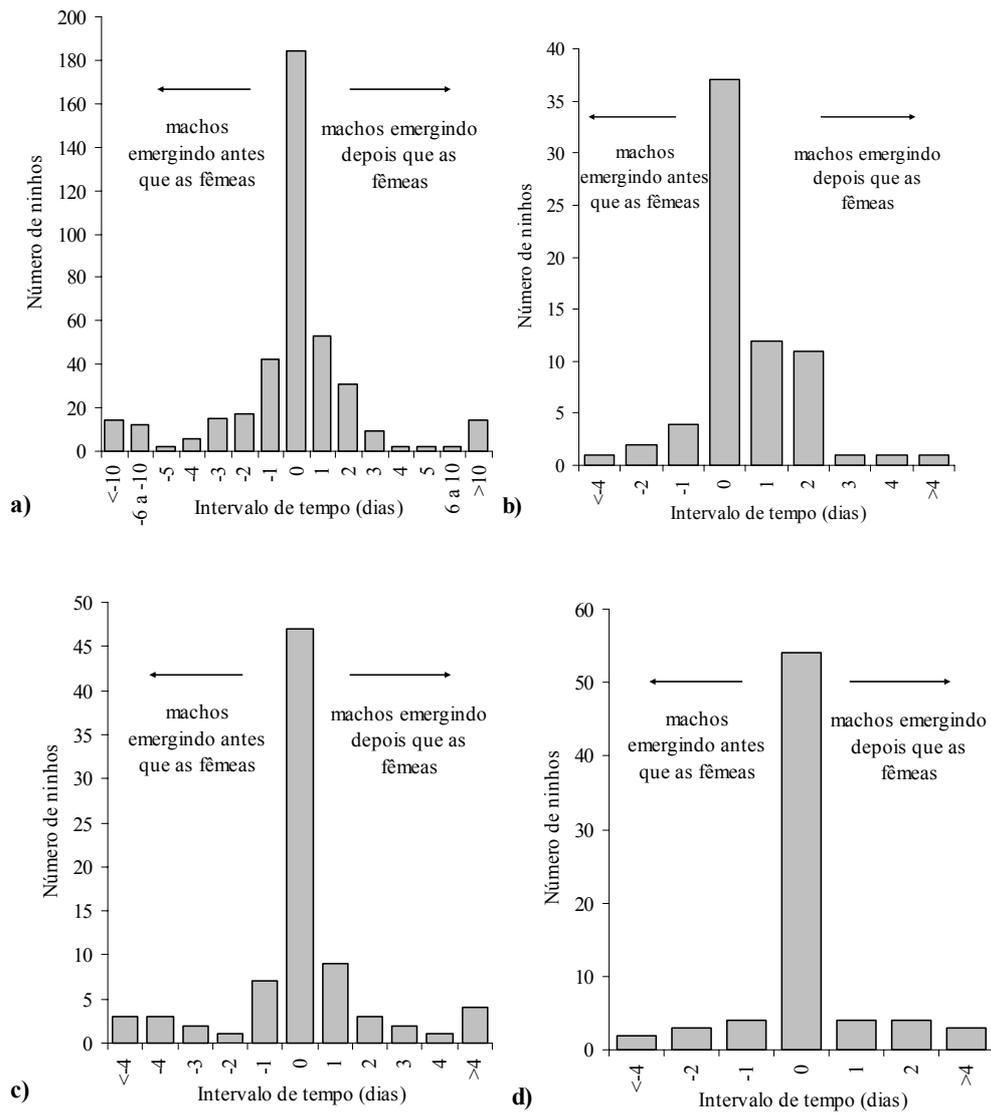
**Figura 3.** Regressão linear do diâmetro e do número de células dos ninhos-armadilha sobre o arcosseno da porcentagem de machos de a) e b) *Trypoxylon rogenhoferi* ( $F = 1,87$ ;  $gl = 105$ ;  $P = 0,17$ ;  $F = 15,09$ ;  $GL = 105$ ;  $P = 0,00$ , respectivamente) e c) e d) *Trypoxylon aurifrons* ( $F = 0,93$ ;  $gl = 39$ ;  $P = 0,66$ ;  $F = 15,38$ ;  $GL = 22$ ;  $P = 0,00$ , respectivamente).



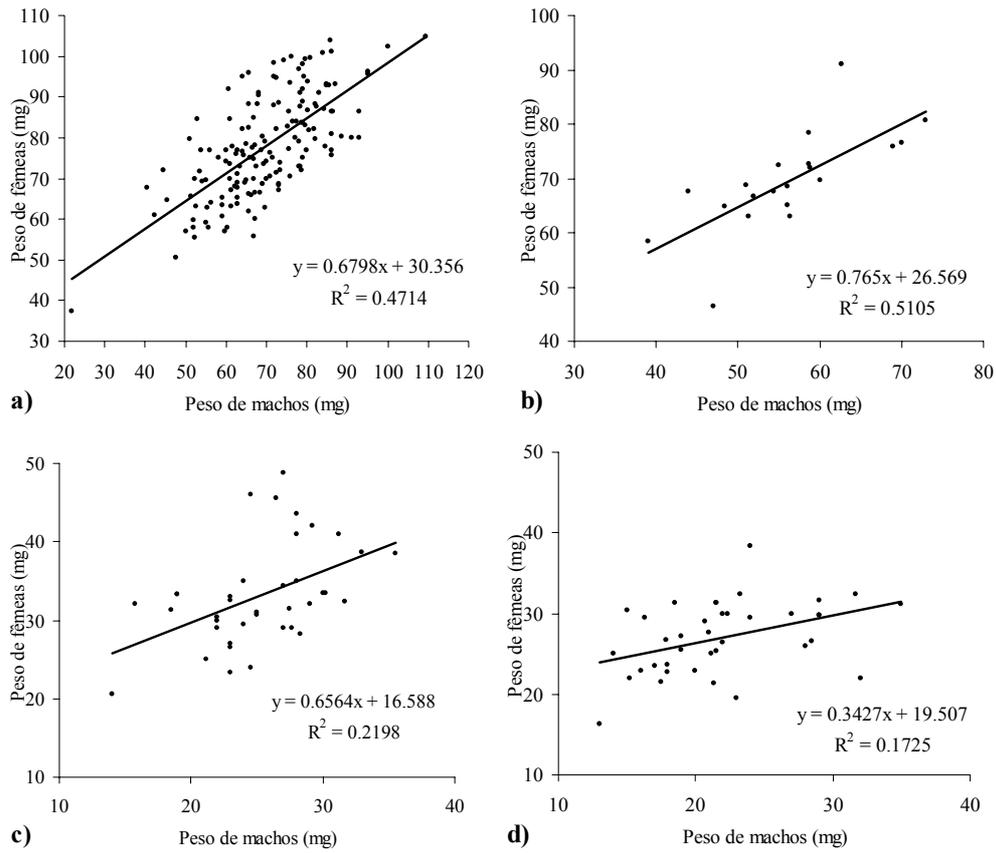




**Figura 4.** Variação sazonal do peso (mg) de adultos de espécies de *Trypoxylon* coletados em Araras (a – d) e Rifaina (e – f). Os valores apresentados no gráfico correspondem às médias e o desvio padrão está representado pelas barras verticais de cada ponto. Os valores nas caixas representam o teste *t* comparando aos pesos (mg) de machos e fêmeas para cada estação. \*  $P < 0,05$ .



**Figura 5.** Número de ninhos de: a) *Trypoxylon rogenhoferi*; b) *Trypoxylon lactitarse*; c) *Trypoxylon aurifrons* e d) *Trypoxylon nitidum* em cada classe de intervalo de tempo (dias) de acordo com a emergência do primeiro macho com a primeira fêmea de cada ninho. Valores nulos representam emergência simultânea, valores negativos, emergência anterior do macho e valores positivos, emergência anterior d fêmea.



**Figura 6.** Correlação entre os pesos médios de machos e fêmeas do mesmo ninho de a) *Trypoxylon rogenhoferi* (n = 156 ninhos; P = 0,00); b) *Trypoxylon lactitarse* (n = 20 ninhos; P = 0,00); c) *Trypoxylon aurifrons* (n = 38 ninhos; P = 0,00) e d) *Trypoxylon nitidum* (n = 38 ninhos; P = 0,01).

## 4.5 Caracterização Alozímica, Estrutura Genética Populacional e Intranidal de Vespas do Gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae)

### 4.5.1 Introdução

O estudo da genética das populações naturais foi consideravelmente facilitado com o desenvolvimento de métodos de análise que resultou na descrição de grande número de marcadores moleculares. Neste sentido, a detecção dos polimorfismos enzimáticos representou passo significativo na mudança paradigmática que a genética das populações sofreu a partir dos anos 60. A eletroforese em gel de amido descrita por Smithies (1955), associada a procedimentos histoquímicos, resultou na técnica do zimograma (Hunter e Market 1957), em que variantes enzimáticas poderiam ser detectadas sob o suporte eletroforético. Esta técnica passou a ser uma ferramenta muito útil na caracterização genética de populações (Avisé 1974) em razão de seu baixo custo, facilidade e rapidez laboratoriais e à grande quantidade de dados que são produzidos.

Numerosos estudos em insetos são conduzidos empregando-se alozimas para estimar níveis de variabilidade genética, estrutura populacional e hibridação, verificar características do comportamento reprodutivo, tal como a sistema de acasalamento, além de ajudar a resolver controvérsias e a identificar táxons desconhecidos (Alfenas 1998). As alozimas são também úteis nos estudos de parentesco, uma vez que são marcadores co-dominantes, sendo o heterozigoto caracterizado por um fenótipo diferente dos homozigotos.

A ordem Hymenoptera é extremamente diversa, abrange mais de 120 mil espécies descritas e centenas a serem descobertas (Gauld e Bolton 1996; Goulet e Huber 1993). É constituída de grupos que apresentam diferentes estágios de socialidade, variando desde comportamento solitário, caracterizado pela independência das fêmeas na construção e provisionamento de seus ninhos (Michener 1974), até comportamento eusocial, definido como a presença permanente de castas e cuidado aloparental (Crespi e Yanega 1995).

Na maioria dos Himenópteros, os machos não auxiliam na construção do ninho, tendo um rápido contato com a fêmea apenas na cópula. No entanto, uma característica peculiar do gênero de vespa solitária *Trypoxylon* (*Trypargilum*) é o comportamento de guarda exibido pelos machos: eles permanecem por um extenso período junto ao ninho, ajudando a fêmea em sua construção (Richards 1934; Brockmann 1992; Brockmann e Grafen 1989; Coville 1982).

Um benefício do comportamento de guarda é a defesa do ninho contra parasitas e outros inimigos naturais (Coville 1982). Krombein (1967) sugere que um importante aspecto é a prevenção de usurpação do ninho por outras fêmeas da mesma ou de diferentes espécies. Machos também expulsam outros machos da mesma espécie que tentam entrar no ninho. Além disso, a ocorrência de repetidas cópulas no interior do ninho imediatamente antes da oviposição sugere que o comportamento de guarda assegura ao macho a paternidade da prole, diminuindo o efeito de machos rivais (Coville 1982).

A literatura sobre a genética de populações de vespas *Trypoxylon* (*Trypargilum*) restringe-se aos dados relatados por Peruquetti (2003) em populações de *T. rogenhoferi* Kohl 1884 e *T. albitarse* Fabricius 1804. O objetivo deste trabalho foi caracterizar polimorfismos protéicos em quatro espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*): *T. aurifrons* Shuckard 1937, *T. nitidum* Smith 1856, *T. lactitarse* Saussure 1867 e *T. rogenhoferi* e, a partir destes marcadores, verificar possíveis mudanças na estrutura populacional ao longo do tempo e investigar a estrutura genética intranidal, a fim de avaliar o significado funcional do comportamento de macho-guarda.

#### 4.5.2 Material e Métodos

**Amostragem das espécies.** Ninhos das espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) foram coletados em três áreas localizadas no estado de São Paulo: o *campus* de Araras (22°18'S, 47°22'W, 629 m) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) durante Dezembro de 2003 a Março 2007; o *campus* da UFSCar em São Carlos (22°01'S, 47°53'W, 850 m), durante Novembro de 2004 a Novembro de 2006 e a Fazenda Rio Branco em Rifaina (20°04'S, 47°25'W, 575 m), durante Novembro de 2004 a Março de 2007.

As espécies foram amostradas por meio de ninhos-armadilha feitos com bambus. Estes ninhos foram levados ao Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros (LGEH), onde foram abertos. Os pupários foram colocados individualmente em frascos de vidro, identificados inclusive com a posição em que se encontravam no ninho e mantidos à temperatura ambiente até a emergência do adulto, momento que as espécies eram identificadas. Os adultos foram sexados e mantidos a -20°C até o momento das análises.

**Análises Eletroforéticas.** Extratos de cabeça e mesossoma de adultos ou de pupas das espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) foram utilizados para as análises eletroforéticas (Tabela I). Foi utilizada a técnica de eletroforese horizontal em gel de amido a 14% (Penetrose™ 30, Corn Products Brazil S.A.) de acordo com o método de Smithies

(1955). As soluções-tampão utilizadas nas cubas e no preparo dos géis estão apresentadas na Tabela II.

As amostras foram homogeneizadas em 100 ou 200  $\mu\text{L}$  de solução 0,1% 2-mercaptoetanol e centrifugadas a 4.000 rpm por quinze minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes obtidos foram embebidos em papel Whatman nº3 (5x5mm) e aplicados no gel.

Para a detecção da atividade enzimática foram utilizadas misturas de reação específicas para cada enzima estudada, segundo os protocolos descritos em Harris e Hopkinson (1976). Os sistemas enzimáticos analisados em cada espécie estão apresentados na Tabela III. Para todos os sistemas polimórficos, as variantes eletroforéticas foram nomeadas de acordo com o sistema de Hutchinson *et al.* (1983), que denomina 100 a variante mais comum em cada loco e as demais são nomeadas de acordo com a distância relativa à variante 100.

**Análises de dados.** As variantes eletroforéticas detectadas foram interpretadas como produtos de alelos codominantes diferentes de um gene. Portanto, os termos variante enzimática e alelo serão utilizados alternativamente, referindo-se ora ao produto gênico, ora ao gene alelo que a determina. A partir da definição dos genótipos de cada indivíduo para os locos enzimáticos estudados, foram calculadas as frequências alélicas para cada população amostrada. Uma fêmea de cada ninho analisado foi considerada para estimar os parâmetros populacionais. Para as quatro espécies de *Trypoxylon*, estes parâmetros foram estimados a partir de toda a amostra. Entretanto, para as amostras de *T. aurifrons* provenientes de Araras e Rifaina e de *T. nitidum* proveniente de Araras, estes parâmetros foram também estimados a partir da subdivisão destas populações por ano de coleta (Tabela 1).

Foram estimados alguns parâmetros genéticos utilizando o software Genepop versão 3.3 (Raymond e Rousset 1995), como: i) proporção de locos polimórficos por espécie; ii) proporção de machos diplóides; iii) equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação; iv) heterozigosidade intra-loco e média; v) estatística-F.

Um loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum foi menor que 95%. A fim de quantificar a produção de machos diplóides na população foi utilizada a proporção de machos que são dipóides ( $\phi$ ), definida como o número de machos diplóides sobre o total de machos (diplóides e haplóides).

Foram estimadas a heterozigosidade intra-loco observada ( $H_o$ , dada pela frequência do genótipo heterozigoto na população) e esperada ( $H_e$ , dada pela frequência do genótipo heterozigoto esperada em uma população em EHW, ou seja,  $2pq$ ) e as heterozigosidades médias observada e esperada. Para se obter a heterozigose média, as

proporções obtidas para cada loco foram somadas e divididas pelo número total de locos analisados.

Como parâmetros populacionais foram estimados o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$  a um nível de significância de 5% entre valores observados e esperados) e o desequilíbrio de ligação. Uma população é considerada estar em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) quando as freqüências alélicas obedecem à proporção  $p^2$ ,  $2pq$  e  $q^2$  dos respectivos genótipos, onde  $p$  e  $q$  são as freqüências dos alelos na população ( $p+q=1$ ). Estatisticamente, ao analisar dois locos, é esperado que os alelos de um determinado loco em EHW não estejam associados com os alelos presentes em outro loco também em EHW. O desequilíbrio de ligação (LD) mede a associação não randômica dos alelos em dois locos distintos.

A diferenciação genética das subpopulações de *T. aurifrons* e *T. nitidum* foi verificada pelo componente  $F_{st}$  da estatística  $F$  (Weir e Cockerham 1984), o qual mede a variância da freqüência alélica entre as subpopulações e varia de zero a um (teste de  $\chi^2$  a um nível de significância de 5%).

O parentesco médio intranidal das espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) foi estimado utilizando pelo menos três fêmeas emergidas do mesmo ninho (parentesco de ninho) e o parentesco médio populacional foi estimado a partir das amostras de população (uma fêmea por ninho). As análises foram feitas no aplicativo para Excel GeneA1Ex (Genetic Analysis in Excel – Version 6; 2006). O parentesco e seu erro-padrão foram estimados mediante a estatística  $r$  (Queller e Goodnight 1989), definida como a probabilidade de um alelo no indivíduo  $x$  ser idêntico por descendência a um alelo do indivíduo  $y$ . A fórmula geral derivada pelos autores é:

$$r = \frac{\sum_x \sum_k \sum_l (p_{y_l} - p^*)}{\sum_x \sum_k \sum_l (p_{x_l} - p^*)}$$

onde,  $p_x$  é a freqüência do alelo encontrado no loco  $k$  e posição alélica  $l$ ;  $p_y$  é a freqüência do mesmo alelo em um grupo de indivíduos encontrados na mesma população onde está inserido o indivíduo  $x$ ; e  $p^*$  é a freqüência do alelo na população em conjunto, excluindo da mesma todos os possíveis parentes de  $x$  (Queller e Goodnight 1989). Os valores teóricos de  $r$  são 0,5 (irmãs completas), 0,25 (meio-irmãs) e 0,0 (indivíduos não aparentados). Valores negativos de  $r$  podem ocorrer se as freqüências gênicas dos indivíduos comparados diferirem em direção oposta à média populacional (Queller e Goodnight 1989). Esta estatística exige fraca ou

nenhuma seleção atuando sobre o marcador genético; portanto, os locos devem estar em EHW e não apresentar desequilíbrio de ligação.

As inferências de paternidade foram realizadas da seguinte forma: ii) o número de machos parentais foi estimado a partir de ninhos com, no mínimo, duas fêmeas e um macho; ii) o número de fêmeas fundadoras de cada ninho foi inferido a partir dos haplótipos de, pelo menos, três indivíduos do ninho, sendo pelo menos um deles macho.

#### 4.5.3 Resultados

**Caracterização Alozímica.** Melhor resolução e maior atividade das enzimas de *T. aurifrons*, *T. nitidum* e *T. rogenhoferi* foram obtidas em tampão tris-citrato pH 7,5 e em tampão tris-citrato pH 8,0 para *T. lactitarse*. Para as esterases das quatro espécies, dentre os substratos fluorogênicos utilizados, o que apresentou melhor atividade foi o acetato e propionato de umbeliferona e dentre os ésteres de naftol, a visualização ocorreu com  $\alpha$ -naftil acetato.

As análises eletroforéticas de *T. aurifrons* demonstraram a presença de uma região de atividade esterásica. Quatro variantes foram comuns às três áreas (110, 105, 100 e 85) e uma (90) foi restrita a Araras e Rifaina (Figura 1a). Os sistemas PGM e ICD também apresentaram polimorfismo, caracterizado por três (105, 100 e 95) e duas (102 e 100) variantes, respectivamente, para as três áreas amostradas (Figuras 1b e c) e uma variante exclusiva (110) de PGM em Rifaina.

Os adultos de *T. nitidum* coletados em Araras apresentaram duas regiões de atividade esterásica polimórficas: EST-1 e EST-2, que apresentaram duas (100 e 90) e três (105, 100 e 85) variantes, respectivamente (Figura 2a). Foram encontrados polimorfismos para os sistemas PGM, com três variantes (102, 100 e 95) e ICD, com duas (100 e 90) (Figuras 2b e c, respectivamente).

Em amostras de *T. lactitarse*, provenientes de Araras, duas regiões de esterase (EST-1 e EST-2) foram identificadas e ambas foram polimórficas, apresentando duas (100 e 90) e três variantes (110, 100 e 95), respectivamente (Figura 3a). Uma região polimórfica em PGM foi observada, contendo duas variantes (105 e 100) (Figura 3b) e outra em MDH, com os alelos 100 e 90 (Figura 3c).

As amostras de *T. rogenhoferi* coletadas em Araras revelaram uma região polimórfica de esterase (EST-1), com três variantes (110, 100 e 90), uma de ICD, com as variantes 110, 100 e 90 e uma de MDH com 110 e 100 (Figuras 4a-c). Em Rifaina, além

destes sistemas polimórficos, esta espécie também apresentou polimorfismo para EST-2 (duas variantes: 110 e 100) e PGM-1 (duas variantes: 105 e 100) (Figura 4e) somente em pupas, e para PGM-2 e  $\beta$ -HBDH (110 e 100) (Figuras 4d e 4f). A utilização de pupas desta espécie permitiu verificar que o padrão da MDH nesta fase do desenvolvimento apresenta uma região extra de atividade.

A estrutura quaternária das enzimas pode ser inferida a partir do padrão eletroforético dos heterozigotos. As análises eletroforéticas dos extratos de heterozigotos das espécies de *Trypoxylon* para EST-2 e PGM evidenciaram padrão de duas bandas, sugerindo que estas enzimas possuem uma estrutura monomérica (Figuras 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4d e 4e). No entanto, o padrão eletroforético dos heterozigotos para EST-1, ICD, MDH e  $\alpha$ -GPDH era constituído de três bandas, demonstrando que estas enzimas exibem estrutura dimérica (Figuras 1c, 2c, 3c, 4a, 4b e 4c).

**Medidas de Diversidade Genética e Estrutura Populacional.** De maneira geral, as espécies de *Trypoxylon* apresentaram baixo polimorfismo enzimático, variando de 11% a 31% (Tabela IV). Heterozigosidade média para estas espécies de *Trypoxylon* também foi baixa (Tabela IV), apresentando valores semelhantes a outros himenópteros ( $0,051 \pm 0,049$ DP; n = 69).

Do total de 14 locos enzimáticos testados em *T. aurifrons* nas três localidades, apenas três foram polimórficos (21%) (Tabelas IV e V). Não foram observados machos diplóides para esta espécie. Em Araras e Rifaina, devido às baixas freqüências dos alelos EST-2 110 e 90, os genótipos relativos a estes alelos foram agrupados aos dos alelos 105 e 85, respectivamente. Da mesma forma, os dados referentes aos alelos PGM 105 e 110 das amostras de Rifaina foram agrupados. Considerando todas as fêmeas analisadas para a população de *T. aurifrons* de Araras, apenas o loco EST-2 não se encontrou em EHW (Tabela IV) em razão da falta significativa de heterozigotos na população (Tabela VIII); não foi observado desequilíbrio de ligação entre os locos.

Ao dividir a população de *T. aurifrons* de Araras em três subpopulações (de acordo com o período de coleta) foi possível verificar que o loco EST-2 apresentou valores significativos de  $\chi^2$  para EHW em 2003/2004 e 2005, mas não em 2006/2007 e o alelo mais freqüente (100) foi comum nas três situações (Tabela VI). Em PGM, na primeira e na última coleta foi amostrado o alelo 105, que apresentou baixa freqüência em ambas as situações; uma diminuição na freqüência do alelo 100 do loco PGM foi verificada ao longo das coletas e o mesmo ocorreu para o alelo ICD 102 (Tabela VI). Os maiores valores de heterozigosidade intra-loco foram observados para o loco ICD, nas duas primeiras subpopulações e PGM na

última (Tabela VII). Apenas o loco *EST-2* da primeira subpopulação apresentou heterozigosidade observada significativamente diferente da esperada (Tabela VII) em razão da falta de heterozigotos. Os valores de  $F_{st}$  não foram estatisticamente diferentes de zero (Tabela VIII), não havendo, portanto, estruturação populacional temporal.

A população de *T. aurifrons* de Rifaina apresentou desvio do esperado de EHW para o loco *PGM* ao considerar todas as fêmeas analisadas (Tabela V). Não foi observado desequilíbrio de ligação para os alelos em nenhum loco. Ao analisar a população de Rifaina subdividida por época de coleta, foi encontrado desvio significativo do EHW apenas para o loco *PGM* do segundo período (Tabela VI); neste loco foi observado um aumento na frequência do alelo *105* da primeira para a segunda época, o mesmo ocorrendo para o alelo *ICD 102* (Tabela VI). Os maiores valores de heterozigosidade intra-loco foram observados para o loco *PGM*, que foram semelhantes em ambas subpopulações (Tabela VII). O teste de  $F_{st}$  revelou subestruturação populacional para a amostra coletada nesta localidade (Tabela VIII).

Em São Carlos, além dos alelos *105*, *100* e *85*, observou-se o alelo *110* a uma frequência de 0,05, sendo que seus fenótipos foram agrupados aos do alelo *105* nas análises. Não foi verificado desequilíbrio de ligação nesta população entre os locos. O loco *PGM* foi o que apresentou maior valor de heterozigosidade (Tabela VII).

Em *Trypoxylon nitidum*, dos 13 locos enzimáticos testados, quatro foram polimórficos (31%) (Tabelas IV e V). Não foram observados machos diplóides para esta espécie. A população de *T. nitidum* de Araras apresentou desvios para o EHW nos locos *EST-1* e *EST-2* (Tabela VI) e não apresentou desequilíbrio de ligação entre os locos.

Ao analisar a população de *T. nitidum* subdividida, apenas no primeiro período de coleta foram verificados desvios de EHW em *EST-1* e *EST-2* (Tabela VI). Observou-se um aumento na frequência dos alelos *100*, *105* e *102* para os locos *EST-1*, *EST-2* e *PGM*, respectivamente, da primeira para a segunda época de coleta (Tabela VI). No loco *PGM*, o alelo *95* foi exclusivo da primeira subpopulação e um aumento do alelo *100* de *ICD* foi observado ao longo do tempo (Tabela VI). Em ambas as subpopulações os locos com maior heterozigosidade foram *EST-2* e *ICD* (Tabela VII). Valores de  $F_{st}$  foram significativos (Tabela VIII) e, portanto, foi observada subestruturação populacional.

Em *Trypoxylon lactitarse* proveniente de Araras o grau de polimorfismo encontrado foi de 17% (três locos polimórficos em 18) (Tabelas IV e V) e apenas o loco *EST-2* não se apresentou em equilíbrio de HW (Tabela V). Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os locos. A maior heterozigosidade intra-loco foi encontrada para *EST-2* (Tabela

VII). Do total de machos analisados ( $n = 79$ ), dois foram heterozigotos ( $\phi = 0.03$ ) para o loco *MDH*.

A frequência de polimorfismo em *T. rogenhoferi* foi de 11% (dois locos em 18 analisados) (Tabela IV e V). Os locos *EST-1* e *MDH* apresentaram-se polimórficos para a população de Araras, sendo que o primeiro não se apresentou em EHW (Tabela V). Na população de Rifaina, apesar de apresentar mais locos que mostraram polimorfismo, estes não foram considerados polimórficos uma vez que o alelo mais freqüente apresentou uma frequência maior que 95%. Desta forma, não foram realizadas análises estatísticas para os dados referentes a esta espécie.

**Parentesco Intranidal.** Apesar de serem observados locos que não se apresentavam em EHW, o parentesco foi calculado utilizando todos os marcadores. O parentesco médio populacional foi estimado separadamente para as populações de *T. aurifrons* de Araras e Rifaina e para a população de *T. nitidum* e *T. lactitarse* de Araras, sendo  $0,166 \pm 0,023$ ,  $0,160 \pm 0,020$ ,  $0,231 \pm 0,08$  e  $0,195 \pm 0,12$ , respectivamente.

Quanto ao parentesco médio intranidal, de maneira geral, a presença do guarda pode garantir a ele a paternidade da progênie feminina. No entanto, para alguns ninhos analisados, os valores de parentesco não puderam ser adequadamente distinguidos entre zero ou 0,75 (Tabela VII). Em 37,5% dos ninhos de *T. aurifrons* provenientes de Araras os valores de parentesco não foram estatisticamente diferentes de 0,75 (intervalo de confiança de 95%) e para os ninhos desta espécie provenientes de Rifaina esta estimativa foi de 70%. Já em *T. nitidum* e em *T. lactitarse* os valores foram de 26,3% e 53,8%, respectivamente.

A partir dos ninhos em que foi possível estimar os genótipos dos machos-guarda (suposto pai) (ninhos com pelo menos duas fêmeas e um macho: número de ninhos = 64 de *T. aurifrons*; 22 de *T. nitidum* e 22 de *T. lactitarse*), foi verificado que para a maioria deles (70% *T. aurifrons*; 72% em *T. nitidum* e 77% em *T. lactitarse*) a prole pode ser explicada por uma fêmea fundadora em sistema monogâmico. Portanto, na maioria dos ninhos, o macho-guarda parece garantir a paternidade da prole feminina.

No entanto, resultados que não são explicados por esta hipótese foram detectados, sendo observada a presença de mais de um genótipo parental: a ocorrência de fenótipos incompatíveis com a monandria entre a prole feminina é indicativo de acasalamento múltiplo. Estes resultados foram observados em 19 ninhos de *T. aurifrons*, em seis de *T. nitidum* e em cinco de *T. lactitarse*, em que a poliandria foi detectada em um ou dois locos (Tabela X).

Além disso, evidências de associação e/ou usurpação também puderam ser inferidas. A partir de ninhos com pelo menos duas fêmeas, a “herança” foi verificada pela presença de fenótipos incompatíveis com a hipótese de uma única fêmea fundadora. Em *T. aurifrons*, um dos 100 ninhos estudados apresentou incompatibilidade fenotípica dos indivíduos emergidos no mesmo ninho e em *T. lactitarse*, essa incompatibilidade foi vista em dois dos 29 ninhos (Tabela XI).

#### 4.5.4 Discussão

**Variabilidade Genética.** Em Hymenoptera, a variabilidade genética é baixa, com valores de heterozigosidade média igual a  $0,05 \pm 0,05$  (Packer e Owen 1990; Packer *et al.* 1992; Shoemaker *et al.* 1992; Rosenmeir e Packer 1993, Kukuk e Sage 1994; Chapman e Stewart 1996; Boato e Battisti 1996; Takahashi *et al.* 2001; Boraschi *et al.* 2005; Peruquetti 2003).

Dos 18 locos enzimáticos estudados, três ou quatro destes exibiram polimorfismo (11% a 31%) nas espécies de *Trypoxylon*. A heterozigosidade média verificada não diferiu do valor médio descrito para a maioria dos himenópteros. De maneira geral, esta ordem apresenta baixa variação gênica quando comparada com outros insetos (Crespi 1991) e algumas explicações têm sido propostas para explicar esta redução. Uma delas é a haplodiploidia, o qual reduz o tamanho efetivo da população, aumenta a taxa de fixação dos alelos, dificulta a obtenção de um polimorfismo estável e aumenta a ligação gênica e o “efeito carona” devido aos menores níveis de recombinação (Crozier 1971; Lester e Selander 1979; Pamilo e Crozier 1981; Avery 1984; Owen 1985). Além disso, características comportamentais podem igualmente justificar o baixo polimorfismo nestes insetos: em himenópteros sociais, como poucos indivíduos são responsáveis pela reprodução na colônia, a variabilidade genética é diminuída, diferentemente do que ocorre em espécies solitárias, cujo potencial de variação pode ser maior (Pamilo *et al.* 1978).

Os dados aqui apresentados mostraram valores de heterozigosidade média semelhantes aos relatados por Peruquetti (2003) para *T. albitarse*. No entanto, este autor descreve um maior grau de polimorfismo e de heterozigosidade em populações de *T. rogenhoferi* provenientes de Luis Antônio e São Carlos (SP) quando comparado aos nossos resultados para esta espécie. Dentre os 15 locos estudados por Peruquetti (2003), oito mostraram-se polimórficos. O maior nível de variação detectado foi atribuído por aquele autor ao fato da análise alozímica ter sido realizada em pupas, fase na qual algumas enzimas

exibem expressão diferencial. Entretanto, no presente estudo, apesar de serem utilizados adultos e pupas de *T. rogenhoferi*, a variabilidade genética desta espécie foi muito baixa, prejudicando a estimativa dos parâmetros genéticos.

**Estrutura Populacional.** Os resultados sobre a estruturação populacional de *T. aurifrons* de Rifaina e *T. nitidum* de Araras indicam que estas populações apresentam-se subdivididas temporalmente em decorrência, possivelmente, do método de amostragem adotado: a não reposição dos indivíduos ao local de coleta e a entrada de novos indivíduos na população, causando flutuações nas frequências alélicas, observação de alelos exclusivos em cada período e valores significativos de  $\chi^2$  para o EHW quando utilizada toda a amostra.

Esta subestruturação temporal das populações de *Trypoxylon* não é um resultado esperado considerando-se o comportamento filopátrico das fêmeas deste gênero (Peruquetti 2003). Mudanças nas frequências alélicas ao longo do tempo são esperadas quando um pequeno número de indivíduos coloniza uma área e, com o passar do tempo, há migração (Sugg *et al.* 1996). No entanto, Molumby (1997) relata a existência de filopatria diferenciada entre os sexos em *Trypoxylon*: as fêmeas permanecem nos locais de emergência (onde nidificariam) e os machos ficam nestes locais por um período variável, dispersando-se posteriormente. Ao estudar populações de *T. rogenhoferi* e *T. albitarse*, Peruquetti (2003) confirmou este comportamento de dispersão e filopatria de machos e fêmeas destas espécies.

O comportamento de dispersão do macho torna menos provável o cruzamento entre irmãos e irmãs. Peruquetti (2003) evidenciou este resultado pela não significância do estimador  $F_{is}$  para as populações analisadas e pela ausência de machos com genótipos diplóides (heterozigotos). No presente estudo, das três espécies em que foi possível a análise dos dados genéticos, *T. lactitarse* foi a única que apresentou machos diplóides. Este resultado pode ser um indicativo de endogamia para esta população.

Em Hymenoptera, a haplodiploidia arrenótoca é observada na maioria das espécies. A presença de machos diplóides é considerada custosa (Owen e Packer 1994) e sua ocorrência tem sido investigada nas espécies de aculeados (Roubik *et al.* 1996; Takahashi *et al.* 2002; Souza *et al.* em preparação). De acordo com Cook (1993), o modelo CSD (Complementary Sex Determination) é o que melhor explica o mecanismo de determinação do sexo na maioria das espécies de Hymenoptera. Neste, o sexo é determinado por múltiplos alelos de um loco único; os indivíduos heterozigotos se desenvolvem em fêmeas, enquanto que indivíduos hemi ou homozigotos se desenvolvem em machos (Whiting 1939). Segundo este modelo, a endogamia leva à maior homozigose dos alelos sexuais e, assim, à ocorrência de machos diplóides.

Vale ressaltar que os machos heterozigotos de *T. lactitarse* foram coletados no último ano de análise, período em que a população estava em declínio (Capítulo 1). Desta forma, foi possível verificar que o método de amostragem adotado pode causar conseqüências como a subestruturação e a endogamia para as populações de *Trypoxylon*.

**Parentesco intranidal.** Os valores de parentesco médio estimado entre os indivíduos das populações de *T. aurifrons*, *T. nitidum* e *T. lactitarse* foram baixos. Este resultado permite afirmar que a maioria das fêmeas de cada espécie, provenientes das localidades estudadas, não é geneticamente relacionada.

Valores não significativamente diferentes de 0,75 de parentesco intranidal são esperados quando o ninho é formado por irmãs completas, isto é, um único macho é responsável pela paternidade dos ninhos. Nas espécies de *Trypoxylon* aqui estudadas, *T. aurifrons* (proveniente de Rifaina) foi aquela que apresentou maior número de ninhos em que a paternidade pode ser atribuída a um único macho (70%), enquanto que para as outras espécies esta estimativa foi baixa. Em vários destes ninhos, os valores de parentesco não puderam ser distinguidos entre zero ou 0,75. Ainda, valores negativos e significativos de *r* foram encontrados, indicando que as freqüências alélicas dos indivíduos encontrados num ninho diferem em direção oposta em relação à média populacional (Queller e Goodnight 1989).

Em *T. albitarse* e *T. rogenhoferi*, Peruquetti (2003) encontrou que na maioria dos ninhos desta espécie a paternidade da progênie feminina devia-se à presença do macho-guarda. Mas, assim como neste trabalho, Peruquetti (2003) obteve estimativas de parentesco com erros-padrão elevados. Este autor discute dois fatores que podem reduzir o parentesco entre as fêmeas nascidas em um mesmo ninho: i) mais de uma fêmea ovipositando em um mesmo ninho (usurpação/associação) e ii) acasalamentos múltiplos. A presença de ninhos em que se observou incompatibilidade de genótipos para uma hipótese de monoginia e monandria sugere a ocorrência de ambos os fatores para as espécies de *Trypoxylon* estudadas.

**A guarda do ninho.** Quando a fêmea acasala-se mais de uma vez, ela cria a oportunidade de competição entre os espermatozoides dos seus parceiros, a qual determina qual macho fertiliza o maior número de ovos (Alcock 1991). Parker (1984) verificou que há competição espermática em insetos e o último macho a se acasalar antes da oviposição freqüentemente tem a vantagem de fertilizar os ovos. Este processo chama-se precedência espermática e é encontrada na maioria dos himenópteros estudados (Michener 1974). A ocorrência de competição espermática nas espécies de insetos tem resultado em comportamentos de acasalamento que são explicados por evolução convergente (Alcock

1991). Uma tática comum é a de permanecer junto à fêmea momentos antes da oviposição e após a cópula. Dessa forma, este macho encontra-se em posição de repelir possíveis machos competidores (Parker 1970; Alcock 1983).

O benefício direto do macho em se manter guarda é a redução da probabilidade da fêmea se acasalar novamente com machos rivais antes da oviposição e, conseqüentemente, causar uma eliminação ou diluição espermática. No entanto, este comportamento apresenta custos (Alcock 1991). A teoria evolutiva prevê que a guarda deva evoluir somente se os benefícios reprodutivos deste comportamento excederem os custos. Ainda, é esperado que algumas condições estejam associadas ao surgimento desta característica, como a falta de fêmeas receptivas, acasalamento múltiplo das fêmeas receptivas e alta competição pelas fêmeas receptivas (Yamamura 1986). Estas condições favorecem o comportamento de guarda dos machos por eles terem a chance de repelir seus oponentes.

Em esfecídeos, o comportamento de guarda de ninhos pelos machos é restrito a alguns representantes (Brockmann 1992) e provavelmente é derivado do hábito territorial do macho (Alcock 1975; Alcock *et al.* 1978; Brockmann e Grafen 1989). Machos de algumas espécies de esfecídeos usualmente mantêm-se próximos aos agregados de ninhos, defendendo a área contra outros machos e este comportamento de guarda certamente reduz o impacto de competidores e alguns inimigos naturais (Coville e Coville 1980). Além disso, auxiliam indiretamente na construção do ninho. Brockmann e Grafen (1989) demonstraram que as fêmeas de *T. politum* assistidas por machos guardas levam menos tempo para aprovisionarem suas células de cria. Conseqüentemente, estes ninhos foram menos parasitados, já que foram completados mais rapidamente.

Em espécies de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) as fêmeas são maiores que os machos e são produzidas em células de cria com mais aprovisionamento (Molumby 1997; Peruquetti e Del Lama 2003a). Molumby sugere que o dimorfismo sexual poderia facilitar a evolução do comportamento de guarda do ninho nas espécies de *Trypargilum*: o macho “ajudaria” sua parceira a aprovisionar melhor as células de cria para que prole feminina fosse produzida, beneficiando-se, portanto, de seu comportamento.

Um outro aspecto importante do gênero *Trypargilum* é a independência de fêmeas na construção do ninho. Assim como a maioria dos esfecídeos, as fêmeas são solitárias e cada uma constrói e aprovisiona seus próprios ninhos. Construções simultâneas de ninhos não ocorrem nas espécies desse grupo (Amarante 1991; Brockmann 1992; Molumby 1997; Peruquetti 2003). Por estes motivos (guarda do ninho e única fêmea) é possível testar nos ninhos deste grupo uma herança monândrica e monogínica dos locos alozímicos.

Em parte dos ninhos das espécies de *Trypoxylon* estudadas foi possível verificar que a “herança” não estava de acordo com os padrões esperados, sendo encontrados ninhos com mais de um macho parental. Coville e Coville (1980) sugerem que é possível que haja estratégias de acasalamento alternativas dos machos de *Trypargilum*. Assim, os machos que não apresentam comportamento de guarda copulariam com as fêmeas enquanto estas estivessem fora de seus ninhos.

Cópulas extra-par podem ocorrer nestas espécies enquanto as fêmeas estão forrageando (Coville e Coville 1980; Garcia e Adis 1995) e a ausência do macho-guarda no ninho pode resultar em estrutura genética intranidal mais complexa pela paternidade associada a mais de um macho parental. No entanto, é muito rara a observação de ninhos sem a presença do macho-guarda. Em estudos de observação de espécies de *Trypoxylon* (Coville e Coville 1980; Garcia e Adis; Brockmann e Grafen 1989) tem sido notado que em todos os ninhos a presença do macho é essencial para que a fêmea comece a construir o ninho e as múltiplas cópulas no interior deste, momentos antes da oviposição, são confirmadas pelos autores acima citados. Desta maneira, é possível sugerir que a existência de ninhos em que a paternidade deve ser atribuída a mais de um macho pode ser resultado da baixa eficiência na eliminação dos espermatozoides de machos competidores pelo macho-guarda (Simmons 2001, 2005).

Em contraste com o princípio de Bateman (1984), no qual apenas machos se beneficiariam com o aumento do número de cópulas, estudos atuais têm mostrado que as fêmeas também recebem benefícios com acasalamentos extra-par. Várias hipóteses sobre benefício genético são propostas para explicar a evolução da poliandria (Simmons 2005). Vários outros estudos em insetos e aracnídeos, (Konior *et al.* 2001; Pai e Yan 2002; Watson 1991), répteis (Olsson *et al.* 1994), aves (Kempnaers *et al.* 1998) e mamíferos (Hooglund 1998) têm demonstrado correlação positiva entre o grau de poliandria e o sucesso de oviposição ou viabilidade da prole.

Em algumas espécies de aves, tem sido discutido que a razão dos acasalamentos extra-par das fêmeas é a de aumentar o seu sucesso reprodutivo, chocando uma maior proporção de ovos (Gray 1997). Em insetos sociais, alguns estudos evidenciaram que maior produtividade e resistência a doenças da colônia estavam associadas a rainhas que apresentaram múltiplos acasalamentos (Hughes e Boomsma 2004; Wiernasz *et al.* 2001), e estes resultados têm sido utilizados para confirmar a hipótese de diversidade genética na evolução da poliandria.

A observação de ninhos em que foi inferida uma associação e/ou usurpação de fêmeas foi relatada em *T. albitarse* e em *T. rogenhoferi* por Peruquetti (2003). Neste trabalho,

o autor discute que a nidificação não foi conjunta ou simultânea, havendo um intervalo entre a nidificação das várias fêmeas em um mesmo ninho, uma vez que se observou fenótipos incompatíveis em posições terminais do ninho e pela presença de uma fêmea com fenótipo diferente do fenótipo da prole em ninho já terminado. Contudo, os ninhos observados neste trabalho apresentaram fenótipos incompatíveis em indivíduos que se encontravam nas células de cria intermediárias, sugerindo associação simultânea de fêmeas, o que contraria as observações de Amarante (1991), Brockmann (1992), Molumby (1997) e Peruquetti (2003).

No presente estudo, procurou-se inferir o sistema de acasalamento dos adultos na natureza mediante uma abordagem genética indireta, estimando-se o nível de parentesco genético e a herança dos fenótipos alozímicos entre a prole de cada ninho. No entanto, o baixo polimorfismo enzimático em himenópteros, incluindo as espécies do gênero *Trypoxylon*, faz com que esta metodologia tenha pouca aplicabilidade neste grupo (Garnery *et al.* 1992), principalmente para o objetivo pretendido. Desta forma, os resultados de acasalamento extra-par e associação e/ou usurpação podem estar subestimados. Nos últimos anos, estudos com espécies que apresentam comportamento monogâmico têm verificado que a estrutura genética intranidal não confirma o esperado para tal comportamento (Akçay e Roughgarden 2007). Portanto, estudos de biologia da nidificação e observação de acasalamento aliados a marcadores genéticos mais polimórficos, como os microsatélites, permitirão estabelecer com maior acurácia o comportamento de nidificação e o sistema de acasalamento nas espécies de *Trypoxylon*, bem como o sucesso reprodutivo de machos e fêmeas de acordo com suas estratégias reprodutivas.

**Tabela I.** Número de amostras e de ninhos utilizados em análises eletroforéticas de quatro espécies de *Trypoxylon*.

<b>Espécie</b>	<b>Área - Época</b>	<b>Número de amostras (machos/fêmeas ou pupas)</b>	<b>Número de ninhos</b>	<b>Número de fêmeas (população)</b>
<i>T. aurifrons</i>	Araras (2003/2004)	98 (34/64)	42	32
	Araras (2005)	59 (29/30)	22	16
	Araras (2006/2007)	22 (7/15)	13	10
	Rifaina (2004/2005)	128 (58/70)	43	34
	Rifaina (2006/2007)	62 (28/34)	48	46
<i>T. nitidum</i>	São Carlos (2004/2006)	30 (11/19)	13	13
	Araras (2003/2004)	253 (110/143)	58	52
<i>T. lactitarse</i>	Araras (2005/2006)	45 (15/30)	29	20
<i>T. rogenhoferi</i>	Araras (2005/2006)	156 (79/77)	34	34
	Araras (2006/2007)	39 (18/21)	8	6
	Rifaina (2006/2007)	58 (3/55) 58 pupas	17	13

**Tabela II.** Soluções-tampão e condições eletroforéticas usadas para as análises alozímicas em espécies de *Trypoxylon*.

<b>Código</b>	<b>Sistema</b>	<b>Tampão da cuba (eletrodos)</b>	<b>Tampão do Gel</b>	<b>Condições (Amperagem/hora)</b>
A	TC 7,5	tris 100 mM + ácido cítrico 28 mM, pH 7.5	Diluído 8x	55 mA, 5:30h
B	TC 7,5	tris 100 mM + ácido cítrico 28 mM, pH 7.5	Diluído 10x	60 mA, 5:00h
C	TC 8,0	tris 250 mM + ácido cítrico 57 mM, pH 8.0	tris 17 mM + ácido cítrico 2,3 mM, pH 8.0	55 mA, 5:30h
D	TC 8,0	borato 300 mM, pH 8.0	tris 17 mM + ácido cítrico 2,3 mM, pH 8.0	30 mA, 4:00h

**Tabela III.** Sistemas enzimáticos, classificação e abreviação de acordo com “Enzyme Commission” (EC) e as respectivas soluções-tampão utilizadas em cada sistema (Tabela II).

Sistema Enzimático	Classificação	Tampão	Resolução
Aconitase <sup>l</sup>	ACO – EC 4.2.1.3	A	S
Aldolase <sup>l</sup>	ALD – EC 4.1.2.13	A	S
Adenilato quinase <sup>a,r</sup>	AGK – EC 2.7.3.3	D	I
Enzima málica <sup>a,n,l,r</sup>	ME – EC 1.1.1.40	A, B, D	I
Esterases <sup>a,n,l,r</sup>	EST – EC 3.1.1.1	A, B, D	S
Fosfoglicomutase <sup>a,n,l,r</sup>	PGM – EC 2.7.5.1	A, B	S
Glicose-6-fosfato isomerase <sup>a,n,l,r</sup>	GPI – EC 5.3.1.9	A, B	S
Fumarase <sup>l</sup>	FUM – EC 4.2.1.2	A	S
6-fosfogliconato desidrogenase <sup>a,n,l,r</sup>	6PGDH – EC 1.1.1.44	A, B	S
Glicose-6-fosfato desidrogenase <sup>a,l,r</sup>	G6PDH – EC 1.1.1.49	A, B	S
Hexoquinase <sup>a,n,l,r</sup>	HK – EC 2.7.1.1	A,	I
Isocitrato desidrogenase <sup>a,n,l,r</sup>	ICD – EC 1.1.1.42	A, B,	S
Leucil aminopeptidase <sup>a,n,l,r</sup>	LAP – EC 3.4.11.1	D	S
Malato desidrogenase <sup>a,n,l,r</sup>	MDH – EC 1.1.1.37	A, B, D	S
Manose-6-fosfato isomerase <sup>l</sup>	MPI – EC 5.3.1.8	A, B	I
Peptidases <sup>a,n,l,r</sup>	PEP – EC 3.4.xx	D	S
$\beta$ -Hidroxiacetato desidrogenase <sup>a,n,l,r</sup>	$\beta$ HBDH – EC 4.1.3.2	A, B, D	S
$\alpha$ -Glicerofosfato desidrogenase <sup>a,n,l,r</sup>	$\alpha$ GPDH – EC 1.1.1.8	A, D	S

a = *Trypoxylon aurifrons*; n = *T. nitidum*; l = *T. lactitarse*; r = *T. rogenhoferi*; S = satisfatória; I = insatisfatória.

**Tabela IV.** Número de locos enzimáticos analisados, grau de polimorfismo, número efetivo de alelos e heterozigosidade média para cada espécie de *Trypoxylon* coletada em três localidades do estado de São Paulo.

Espécie	Número de locos analisados	Número (e proporção) de locos polimórficos*	Número efetivo de alelos	Heterozigosidade média (n)
<i>T. aurifrons</i>	14	3 (21%)	22	0,042±0,087 (112)
<i>T. nitidum</i>	13	4 (31%)	19	0,040±0,069 (39)
<i>T. lactitarse</i>	18	3 (17%)	23	0,022±0,056 (18)
<i>T. rogenhoferi</i>	18	2 (11%)	27	0,004±0,007 (36)

\* critério de 95% (informações sobre a frequência alélica: Tabela V)

**Tabela V.** Frequências alélicas observadas e testes de  $\chi^2$  para verificação da hipótese nula de aderência ao Equilíbrio de HW (EHW) em espécies de *Trypoxylon* coletadas em três localidades do estado de São Paulo. HW: ns = não significativo, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

Espécie	Loco	Localidade	Alelo			EHW
<i>T. aurifrons</i>	EST-2		<b>105</b>	<b>100</b>	<b>85</b>	
		Araras	0,14	0,70	0,16	$\chi^2_{(3)} = 32,44^{***}$
		Rifaina	0,06	0,73	0,21	$\chi^2_{(3)} = 3,02^{ns}$
	PGM	São Carlos	0,23	0,50	0,27	$\chi^2_{(3)} = 1,21^{ns}$
			<b>105</b>	<b>100</b>	<b>95</b>	
		Araras	0,03	0,67	0,30	$\chi^2_{(3)} = 3,53^{ns}$
	ICD	Rifaina	0,17	0,53	0,30	$\chi^2_{(3)} = 16,52^{***}$
		São Carlos		0,36	0,64	$\chi^2_{(3)} = 3,59^{ns}$
			<b>102</b>		<b>100</b>	
		Araras	0,72		0,28	$\chi^2_{(1)} = 0,01^{ns}$
		Rifaina	0,69		0,31	$\chi^2_{(1)} = 1,47^{ns}$
		São Carlos	0,80		0,20	$\chi^2_{(1)} = 0,63^{ns}$
<i>T. nitidum</i>	EST-1		<b>100</b>		<b>90</b>	
		Araras	0,74		0,26	$\chi^2_{(1)} = 14,48^{***}$
	EST-2	Araras	<b>105</b>	<b>100</b>	<b>85</b>	
	PGM	Araras	0,15	0,71	0,14	$\chi^2_{(3)} = 11,76^{**}$
		Araras	<b>102</b>	<b>100</b>	<b>95</b>	
	ICD	Araras	0,03	0,93	0,04	$\chi^2_{(3)} = 6,82^{ns}$
	Araras	<b>100</b>		<b>90</b>		
	Araras	0,68		0,32	$\chi^2_{(1)} = 1,40^{ns}$	
<i>T. lactitarse</i>	EST-1	Araras	<b>100</b>		<b>90</b>	
		Araras	0,99		0,01	-
	EST-2	Araras	<b>110</b>	<b>100</b>	<b>95</b>	
	PGM	Araras	0,04	0,49	0,47	$\chi^2_{(3)} = 8,86^*$
		Araras	<b>105</b>		<b>100</b>	
	MDH	Araras	0,06		0,94	$\chi^2_{(1)} = 0,13^{ns}$
	Araras	<b>100</b>		<b>90</b>	$\chi^2_{(1)} = 0,13^{ns}$	
	Araras	0,84		0,16	$\chi^2_{(1)} = 1,27^{ns}$	
<i>T. rogenhoferi</i>	EST-1	Araras	<b>110</b>	<b>100</b>	<b>90</b>	
		Araras	0,08	0,88	0,04	$\chi^2_{(3)} = 12,03^{**}$
		Rifaina	0,03	0,96	0,02	-
	ICD	Araras	<b>110</b>	<b>100</b>	<b>90</b>	
		Araras	0,04		0,96	-
		Rifaina	0,02		0,98	-
	MDH	Araras	<b>110</b>		<b>100</b>	
		Araras	0,92		0,08	$\chi^2_{(1)} = 0,10^{ns}$
		Rifaina	0,01		0,99	-
	EST-2	Rifaina	<b>110</b>		<b>100</b>	
		Rifaina	0,03		0,97	-
	PGM-1	Rifaina	<b>105</b>		<b>100</b>	
		Rifaina	0,97		0,03	-
	PGM-2	Rifaina	<b>110</b>		<b>100</b>	
	Rifaina	0,04		0,96	-	
B-HBDH	Rifaina	<b>110</b>		<b>100</b>		
	Rifaina	0,99		0,01	-	

**Tabela VI.** Frequências alélicas em locos enzimáticos de populações de *Trypoxylon* subdivididas por época de coleta, provenientes de três cidades do estado de São Paulo.

Espécie	Loco	Localidade (Época)	Alelos			Teste de HW
<i>T. aurifrons</i>	<b>EST-2</b>		<b>105</b>	<b>100</b>	<b>85</b>	
		Araras (2003/2004)	0,17	0,66	0,17	$\chi^2_{(3)} = 27,85^{***}$
		Araras (2005)	0,09	0,78	0,13	$\chi^2_{(3)} = 9,21^*$
		Araras (2006/2007)	0,10	0,70	0,20	$\chi^2_{(3)} = 3,42^{ns}$
		Rifaina (2004/2005)	0,04	0,69	0,27	$\chi^2_{(3)} = 0,49^{ns}$
	Rifaina (2006/2007)	0,08	0,76	0,16	$\chi^2_{(3)} = 3,12^{ns}$	
	<b>PGM</b>		<b>105</b>	<b>100</b>	<b>95</b>	
		Araras (2003/2004)	0,05	0,73	0,22	$\chi^2_{(3)} = 2,90^{ns}$
		Araras (2005)		0,63	0,37	$\chi^2_{(3)} = 1,20^{ns}$
		Araras (2006/2007)	0,05	0,50	0,45	$\chi^2_{(3)} = 1,13^{ns}$
		Rifaina (2004/2005)	0,03	0,50	0,67	$\chi^2_{(3)} = 0,56^{ns}$
	Rifaina (2006/2007)	0,27	0,56	0,17	$\chi^2_{(3)} = 11,43^{**}$	
	<b>ICD</b>		<b>102</b>	<b>100</b>		
		Araras (2003/2004)	0,77	0,23		$\chi^2_{(1)} = 2,56^{ns}$
		Araras (2005)	0,69	0,31		$\chi^2_{(1)} = 0,43^{ns}$
Araras (2006/2007)		0,65	0,35		$\chi^2_{(1)} = 2,09^{ns}$	
Rifaina (2004/2005)		0,63	0,37		$\chi^2_{(1)} = 3,56^{ns}$	
Rifaina (2006/2007)	0,73	0,27		$\chi^2_{(1)} = 0,09^{ns}$		
<i>T. nitidum</i>	<b>EST-1</b>		<b>100</b>		<b>90</b>	
		Araras (2003/2004)	0,69	0,31		$\chi^2_{(1)} = 12,91^{***}$
	Araras (2005/2006)	0,92	0,08		$\chi^2_{(1)} = 0,10^{ns}$	
	<b>EST-2</b>		<b>105</b>	<b>100</b>	<b>85</b>	
		Araras (2003/2004)	0,13	0,75	0,12	$\chi^2_{(3)} = 10,19^{**}$
	Araras (2005/2006)	0,23	0,60	0,17	$\chi^2_{(3)} = 2,97^{ns}$	
	<b>PGM</b>		<b>102</b>	<b>100</b>	<b>95</b>	
		Araras (2003/2004)	0,01	0,93	0,05	$\chi^2_{(3)} = 4,49^{ns}$
	Araras (2005/2006)	0,07	0,93		$\chi^2_{(3)} = 0,13^{ns}$	
	<b>ICD</b>		<b>105</b>	<b>100</b>		
Araras (2003/2004)		0,74	0,26		$\chi^2_{(1)} = 0,01^{ns}$	
Araras (2005/2006)	0,50	0,50		$\chi^2_{(1)} = 2,57^{ns}$		

HW: ns = não significativo, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001.

**Tabela VII.** Heterozigosidade intra-loco observada e esperada e heterozigosidade média ( $\pm$  Erro padrão) em espécies de *Trypoxylon* coletadas em três localidades do estado de São Paulo durante três anos. \*Valores significativos de  $\chi^2$ .

<i>Espécies</i>	<i>Localidade Época</i>	<i>Loco</i>	<i>Heterozigosidade</i>		<i>Localidade (Época)</i>	<i>Heterozigosidade</i>		<i>Localidade (Época)</i>	<i>Heterozigosidade</i>			
			<i>Obs.</i>	<i>Esp.</i>		<i>Obs.</i>	<i>Esp.</i>		<i>Obs.</i>	<i>Esp.</i>		
<i>T. aurifrons</i>	Araras (Total)	<i>EST-2</i>	0,10	0,24*	Rifaina (Total)	0,18	0,21	São Carlos (Total)	0,35	0,32		
		<i>PGM</i>	0,18	0,23		0,23	0,30		0,36	0,34		
		<i>ICD</i>	0,20	0,20		0,19	0,22		0,20	0,17		
		<b>Média</b>	<b>0,034</b>	<b>0,048</b>		<b>Média</b>	<b>0,043</b>		<b>0,052</b>	<b>Média</b>	<b>0,065</b>	<b>0,059</b>
		<b>EP</b>	<b>0,021</b>	<b>0,020</b>		<b>EP</b>	<b>0,020</b>		<b>0,020</b>	<b>EP</b>	<b>0,021</b>	<b>0,021</b>
	Araras (2003/2004)	<i>EST-2</i>	0,09	0,26*	Rifaina (2004/2005)	0,21	0,23					
		<i>PGM</i>	0,16	0,21		0,23	0,27					
		<i>ICD</i>	0,23	0,18		0,16	0,24					
		<b>Média</b>	<b>0,034</b>	<b>0,046</b>		<b>Média</b>	<b>0,043</b>					<b>0,053</b>
		<b>EP</b>	<b>0,021</b>	<b>0,020</b>		<b>EP</b>	<b>0,020</b>					<b>0,020</b>
	Araras (2005)	<i>EST-2</i>	0,09	0,19	Rifaina (2006/2007)	0,16	0,20					
		<i>PGM</i>	0,17	0,24		0,23	0,30					
		<i>ICD</i>	0,25	0,22		0,21	0,20					
		<b>Média</b>	<b>0,036</b>	<b>0,046</b>		<b>Média</b>	<b>0,043</b>					<b>0,050</b>
		<b>EP</b>	<b>0,022</b>	<b>0,020</b>		<b>EP</b>	<b>0,020</b>					<b>0,020</b>
	Araras (2006/2007)	<i>EST-2</i>	0,15	0,24								
		<i>PGM</i>	0,30	0,29								
<i>ICD</i>		0,05	0,24									
<b>Média</b>		<b>0,036</b>	<b>0,055</b>									
<b>EP</b>		<b>0,024</b>	<b>0,020</b>									
<i>T. nitidum</i>	Araras (Total)	<i>EST-1</i>	0,09	0,19								
		<i>EST-2</i>	0,18	0,23								
		<i>PGM</i>	0,06	0,07								
		<i>ICD</i>	0,18	0,22								
		<b>Média</b>	<b>0,039</b>	<b>0,178</b>								
	<b>EP</b>	<b>0,017</b>	<b>0,004</b>									
	Araras	<i>EST-1</i>	0,09	0,22								

	(2003/2004)	<i>EST-2</i>	0,15	0,21
		<i>PGM</i>	0,05	0,06
		<i>ICD</i>	0,20	0,19
		<b>Média</b>	<b>0,038</b>	<b>0,052</b>
		<b>EP</b>	<b>0,067</b>	<b>0,090</b>
	Araras	<i>EST-1</i>	0,08	0,08
	(2005/2006)	<i>EST-2</i>	0,25	0,29
		<i>PGM</i>	0,08	0,07
		<i>ICD</i>	0,14	0,26
		<b>Média</b>	<b>0,042</b>	<b>0,054</b>
		<b>EP</b>	<b>0,077</b>	<b>0,102</b>
<hr/>				
<i>T. lactitarse</i>	Araras	<i>EST-2</i>	0,18	0,27
	(Total)	<i>PGM</i>	0,06	0,06
		<i>MDH</i>	0,16	0,14
		<b>Média</b>	<b>0,022</b>	<b>0,157</b>
		<b>EP</b>	<b>0,056</b>	<b>0,106</b>

**Tabela VIII. a)** Valores de  $F_{st}$  par-a-par para as subpopulações de *Trypoxylon aurifrons* e *Trypoxylon nitidum* analisadas para alozimas, provenientes de duas localidades do estado de São Paulo. As letras sobrescritas indicam a significância dos valores de  $\chi^2$ .

<i>T. aurifrons</i>	Araras (2003/2004)	Araras (2005)
Araras (2005)	0,00884 <sup>a</sup>	
Araras (2006/2007)	0,02677 <sup>b</sup>	-0,02394 <sup>c</sup>
<i>T. aurifrons</i>	Rifaina (2004/2005)	
Rifaina (2006/2007)	0,04767 <sup>d</sup>	
<i>T. nitidum</i>	Araras (2003/2004)	
Araras (2005/2006)	0,01869 <sup>e</sup>	

<sup>a</sup> = 0,42040; <sup>b</sup> = 0,48044; <sup>c</sup> = 0,92205; <sup>d</sup> = 0,00059; <sup>e</sup> = 0,0086.

**Tabela IX** – Parentesco médio entre as fêmeas de *Trypoxylon* que emergiram de mesmo ninho, coletadas em duas localidades do estado de São Paulo. N = número de fêmeas analisadas por ninho; R ( $\pm$ EP) = grau de parentesco médio e erro-padrão (Jackknife sobre ninhos); IC 95% = intervalo de confiança.

Araras				Rifaina			
Ninho	N	R ( $\pm$ EP)	IC 95%	Ninho	N	R ( $\pm$ EP)	IC 95%
<i>T. aurifrons</i>				<i>T. aurifrons</i>			
34	3	1		2	5	0,34 (0,13)	-0,68 a 0,66
117	3	1		23	3	-0,77 (0,94)	-0,97 a 1,00
118	3	1		411	3	1	
219	4	0,28 (0,32)	-0,61 a 0,88	571	3	0,12 (0,32)	-1,08 a 1,00
287	3	0,50 (0,21)	-0,80 a 1,00	160	3	0,78 (0,06)	-1,18 a 1,00
291	4	0,19 (0,40)	-0,58 a 0,85	1263	4	0,81 (0,02)	-0,81 a 0,78
445	5	-0,78 (0,99)	-0,44 a 0,72	1264	4	0,60 (0,06)	-0,81 a 0,78
506	3	1		1265	3	1	
509	4	0,09 (0,51)	-0,57 a 0,88	1335	5	1	
589	4	0,12 (0,50)	-0,55 a 0,84	12	4	0,81 (0,01)	-0,81 a 0,75
592	3	1		17	3	0,63 (0,09)	-1,21 a 1,00
805	3	1		286	4	0,78 (0,16)	-0,80 a 0,78
1005	5	0,55 (0,09)	-0,49 a 0,71	289	4	1	
1200	3	1		1183	4	0,30 (0,19)	-0,79 a 0,78
1218	3	1		1202	6	0,47 (0,04)	-0,59 a 0,56
<i>T. nitidum</i>				<i>T. nitidum</i>			
18	3	1		1205	4	0,46 (0,11)	-0,79 a 0,78
45	3	-0,03 (0,69)	-1,98 a 1,00	1213	3	0,29 (0,11)	-0,10 a 1,00
91	5	0,34 (0,44)	-0,96 a 1,00	410	5	0,11 (0,29)	-0,63 a 0,60
92	5	-0,88 (0,98)	-0,89 a 1,00	1431	3	0,66 (0,09)	-1,10 a 1,00
101	4	1					
118	4	1					
125	4	1					
285	6	1					
288	7	1					
289	8	0,33 (0,32)	-0,69 a 1,00				
372	3	1					
404	4	0,14 (0,57)	-1,42 a 1,00				
429	5	1					
503	6	0,26 (0,41)	-0,91 a 0,95				

515	3	0,48 (0,42)	-1,72 a 1,00
546	3	1	
582	7	1	
583	4	1	
586	3	1	
<i>T. lactitarse</i>			
706	5	0,16 (0,44)	-1,33 a 0,81
724	3	-0,18 (0,61)	-0,88 a 1,00
795	3	-0,25 (0,87)	1,94 a 1,00
796	3	0,69 (0,23)	-1,58 a 1,00
830	4	-0,25 (0,88)	-0,96 a 1,00
879	3	1	
1050	3	0,81 (0,14)	-1,58 a 1,00
1084	5	0,47 (0,15)	-1,25 a 0,81
1323	3	1	
1588	3	-0,25 (0,88)	-0,83 a 1,00
1590	3	0,37 (0,33)	-0,88 a 1,00
1591	6	0,88 (0,02)	-0,76 a 0,75
1653	4	0,69 (0,16)	-1,76 a 1,00

**Tabela X.** Ninhos cujos fenótipos aloenzimáticos indicam acasalamentos extra-par de fêmeas das espécies de *Trypoxylon* amostradas em duas localidades do estado de São Paulo. Os possíveis fenótipos parentais estão também apresentados.

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>Amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>EST-2</b>	<b>PGM</b>	<b>ICD</b>
<i>T. aurifrons</i>	Araras	219.1	M	100	95	102
		219.2	F	100/100	<b>100/100</b>	102/100
		219.4	F	100/100	<b>95/95</b>	102/102
		219.5	F	100/100	100/100	-
		219.6	F	100/100	100/95	102/100
			Mãe	100/100	100/95	102/100
			Pai	100	<b>100 e 95</b>	102
		291.1	F	85/85	100/100	102/102
		291.2	F	85/85	100/100	102/102
		291.3	F	<b>85/85</b>	<b>100/95</b>	102/102
		291.4	M	85	100	102
		291.5	M	100	100	102
		291.6	F	<b>105/100</b>	<b>110/100</b>	102/102
			Mãe	100/85	100/95	102/102
			Pai	<b>105 e 85</b>	<b>110 e 100</b>	102
		506.1	M	100	100	100
		506.3	F	<b>100/100</b>	<b>100/100</b>	102/100
		506.6	F	105/100	100/100	102/100
		506.7	F	<b>105/105</b>	<b>105/105</b>	102/100
			Mãe	105/100	105/100	100
	Pai	<b>105 e 100</b>	<b>105 e 100</b>	102		
509.1	M	100	100	102		
509.2	F	105/105	100/100	102/102		
509.3	F	105/100	<b>100/100</b>	102/102		
509.4	F	105/100	<b>105/105</b>	102/102		
509.5	F	105/100	100/100	102/102		
	Mãe	105/100	105/100	102/102		
	Pai	105	<b>105 e 100</b>	102		
526.2	M	105	100	-		
526.3	M	105	100	-		
526.4	M	105	100	102		
526.5	F	105/105	100/100	<b>102/102</b>		
526.6	F	105/105	100/95	<b>100/100</b>		
	Mãe	105	100/95	102		
	Pai	105	100	<b>102 e 100</b>		
805.1	F	100/100	100/100	<b>100/100</b>		
805.2	M	100	100	102		
805.4	F	100/100	100/100	<b>102/102</b>		
805.5	F	100/100	100/100	102/100		
	Mãe	100	100	102/100		
	Pai	100	100	<b>102 e 100</b>		
1005.3	M	100	100	102		
1005.4	F	100/100	95/95	102/102		
1005.5	F	100/100	100/100	102/100		

1005.6	F	100/100	100/95	102/102	
1005.7	F	100/100	100/95	102/102	
1005.9	F	100/100	100/95	102/102	
	Mãe	100	100/95	102/100	
	Pai	100	100 e 95	102	
1021.6	F	100/100	100/95	102/100	
1021.7	F	100/100	<b>100/100</b>	100/100	
1115.2	M	85	100	100	
1115.5	M	100	95	100	
1118.1	F	100/85	<b>95/95</b>	102/100	
1118.3	F	100/85	<b>100/100</b>	102/100	
	Mãe	100	100/95	102	
	Pai	85	<b>100 e 95</b>	100	
Rifaina	2.1	M	100	95	-
	2.3	M	100	100	-
	2.4	F	85/85	100/95	-
	2.5	F	100/85	95/95	-
	2.7	F	<b>105/100</b>	100/95	-
	2.8	F	<b>100/85</b>	95/95	-
	2.9	F	105/100	95/95	-
	Mãe	100/85	100/95		
	Pai	<b>85 e 105</b>	95		
171.1	M	100	100	100	
171.2	F	100/85	100/95	100/100	
171.3	F	100/85	100/100	102/100	
171.4	F	100/85	<b>100/95</b>	102/100	
171.5	F	100/100	<b>105/100</b>	100/100	
	Mãe	100/85	100/95	102/100	
	Pai	100	<b>105 e 100</b>	100	
284.1	M	85	100	100	
284.2	M	85	100	100	
284.3	F	100/85	<b>95/95</b>	100/100	
284.4	F	100/85	<b>100/100</b>	100/100	
284.5	M	85	100	100	
	Mãe	85/85	100/95	100/100	
	Pai	100	<b>100 e 95</b>	100	
286.1	F	100/85	<b>100/100</b>	102/100	
286.2	F	100/100	100/95	102/100	
286.3	F	100/100	100/95	102/100	
286.5	M	85	95	102	
286.6	F	100/100	<b>95/95</b>	102/100	
	Mãe	100/85	100/95	100	
	Pai	100	<b>100 e 95</b>	102	
951.2	M	<b>85/85</b>	<b>100/100</b>	102/102	
951.3	M	100	95	102	
951.6	F	<b>100/100</b>	100/95	102/100	
951.7	F	100/85	100/100	102/102	
951.9	F	100/100	<b>95/95</b>	102/100	
	Mãe	100/85	100/95	102/100	

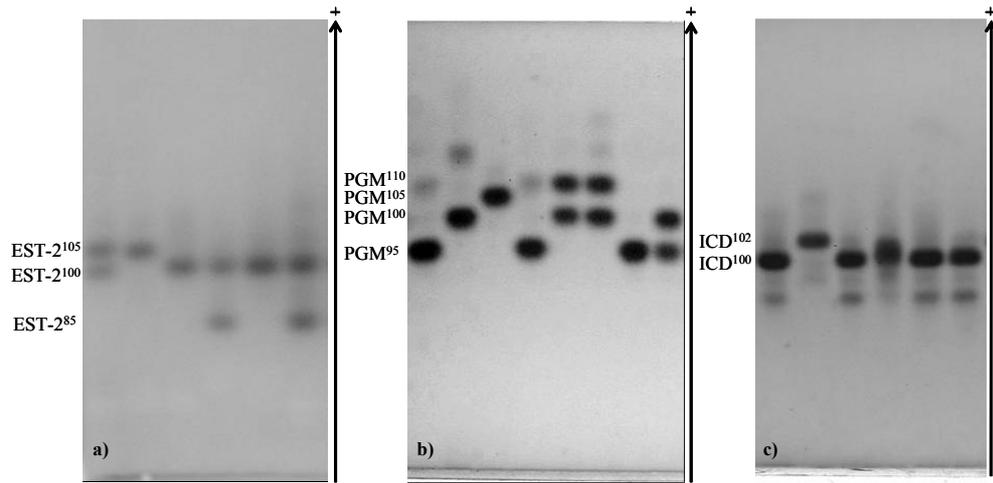
			Pai	<b>100 e 85</b>	<b>100 e 95</b>	<b>102</b>	
		955.1	M	100	100	102	
		955.2	F	100/100	100/95	<b>102/102</b>	
		955.8	F	100/100	<b>95/95</b>	<b>100/100</b>	
		955.9	F	100/100	<b>100/100</b>	102/100	
			Mãe	100/100	100/95	102/100	
			Pai	100	<b>100 e 95</b>	<b>102 e 100</b>	
		1052.1	M	105	105	102	
		1052.2	F	105/100	105/100	<b>102/102</b>	
		1052.3	F	105/100	105/105	<b>100/100</b>	
			Mãe	105/105	105/100	102/100	
			Pai	100	105	<b>102 e 100</b>	
		1202.1	M	100	105	102	
		1202.2	F	100/85	105/100	102/100	
		1202.3	F	100/85	<b>100/95</b>	102/100	
		1202.4	F	100/85	<b>105/100</b>	102/100	
		1202.5	F	100/85	105/100	102/100	
		1202.6	F	100/85	105/100	102/100	
		1202.7	F	100/85	<b>100/100</b>	102/100	
			Mãe	100	105/100	102	
			Pai	85	<b>100 e 95</b>	100	
		1203.1	M	85	100	100	
		1205.1	M	85	100	100	
		1205.2	F	100/85	<b>105/105</b>	102/100	
		1205.3	F	100/85	105/100	102/100	
		1205.4	F	100/85	<b>100/100</b>	102/100	
		1205.5	M	85	100	100	
		1205.6	F	100/85	105/100	102/100	
		1205.7	M	85	100	100	
		1205.8	M	85	100	100	
			Mãe	85/85	105/100	100	
			Pai	100	<b>105 e 100</b>	102	
		1233.5	F	105/85	100/95	102/100	
		1233.6	F	<b>105/85</b>	100/95	102/100	
		1233.7	M	100	100	100	
		1233.8	F	<b>100/100</b>	100/100	102/100	
			Mãe	<b>105/100</b>	100/95	100	
			Pai	<b>100 e 85</b>	100	102	
		1264.1	M	100	100	102	
		1264.2	F	<b>100/85</b>	105/100	102/102	
		1264.3	F	<b>100/100</b>	105/100	102/100	
		1264.4	F	<b>105/100</b>	105/100	102/102	
		1264.5	F	<b>100/100</b>	<b>100/100</b>	102/100	
		1264.6	F	105/100	<b>105/105</b>	102/102	
		1264.7	F	100/100	105/105	102/102	
			Mãe	105/100	105/100	102/100	
			Pai	<b>100 e 85</b>	<b>105 e 100</b>	102	
<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>Amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>EST-1</b>	<b>EST-2</b>	<b>PGM</b>	<b>ICD</b>
<i>T. nitidum</i>	Araras	35.1	M	-	105	100	-

35.2	F	-	<b>100/85</b>	<b>100/100</b>	-
35.5	F	-	<b>105/105</b>	<b>102/102</b>	-
	Mãe		105/100	100	
	Pai		<b>105 e 85</b>	<b>102 e 100</b>	
91.1	F	90/90	105/100	100/95	100/100
91.2	F	-	100/100	100/95	100/100
91.3	F	-	100/100	95/95	100/100
91.5	M	-	100	95	100
91.6	F	90/90	100/100	<b>102/95</b>	100/100
91.7	F	90/90	100/100	<b>100/100</b>	100/100
	Mãe	90	100/100	<b>100/95</b>	100/100
	Pai	90	100	<b>102 e 100</b>	100
92.1	F	-	100/100	100/95	100/100
92.2	F	-	100/100	100/95	100/100
92.3	M	-	100	95	100
92.4	M	-	100	95	100
92.5	M	-	100	95	100
92.6	F	-	<b>100/100</b>	95/95	100/100
92.7	F	-	<b>105/85</b>	100/95	100/100
92.8	F	-	105/85	100/95	100/100
	Mãe		105/100	100/95	100/100
	Pai		<b>100 e 85</b>	95	100
289.1	M	90	100	100	100
289.2	M	100	100	100	100
289.4	F	100/90	100/100	100/100	100/100
289.5	F	90/90	100/100	100/100	100/100
289.6	F	90/90	100/100	100/100	100/100
289.7	F	100/90	100/100	100/100	100/100
289.8	F	100/90	<b>100/100</b>	100/100	100/100
289.9	F	<b>90/90</b>	<b>85/85</b>	100/100	100/100
289.11	F	<b>100/100</b>	100/85	100/100	100/90
289.12	F	100/90	100/100	100/100	100/100
	Mãe	100/90	100/85	100/100	100/90
	Pai	<b>100 e 90</b>	<b>100 e 85</b>	100	100
370.1	M	90	85	100	100
370.4	F	100/100	<b>85/85</b>	100/100	100/100
370.6	F	100/90	<b>100/100</b>	100/100	100/100
	Mãe	100/90	100/85	100/100	100/100
	Pai	100	<b>100 e 85</b>	100	100
404.1	M	100	85	100	90
404.1	M	100	100	100	100
404.2	F	100/100	<b>85/85</b>	100/100	90/90
404.4	M	100	100	100	90
404.5	F	100/100	<b>100/100</b>	100/100	100/90
404.6	F	100/90	100/85	100/100	100/90
404.7	M	100	85	100	
404.8	F	100/90	100/85	100/100	90/90
404.9	M	100	100	100	90
404.11	M	100	100	100	

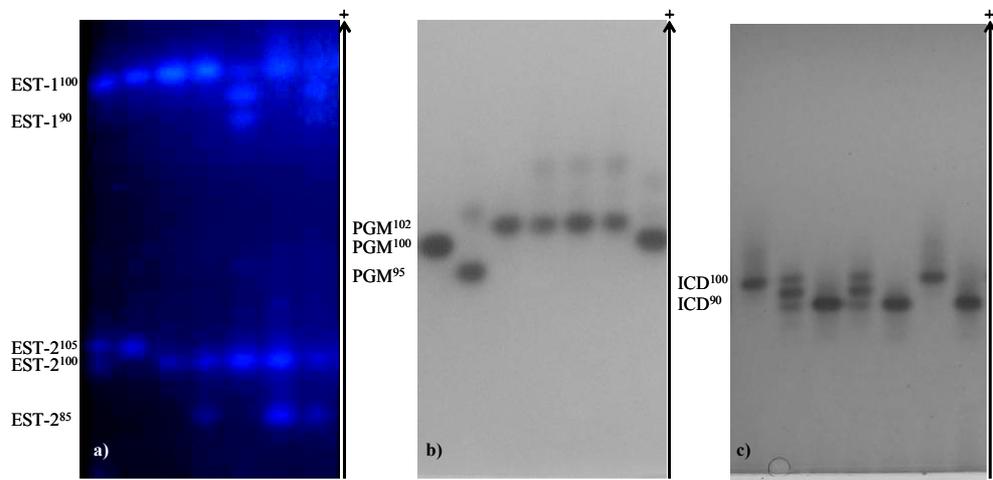
			Mãe	100/90	100/85	100/100	100/90	
			Pai	100	<b>100 e 85</b>	100	90	
<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>Amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>MDH</b>	<b>EST-2</b>	<b>PGM</b>		
<i>T. lactitarse</i>	Araras	706.1	M	110	100	100		
		706.3	F	110/100	<b>100/100</b>	105/100		
		706.4	F	110/100	<b>95/95</b>	105/100		
		706.5	F	110/100	100/95	105/100		
		706.7	F	110/100	95/95	105/100		
		706.9	F	110/100	100/95	105/100		
			Mãe	110/110	100/95	100/100		
			Pai	100	<b>100 e 95</b>	105		
			795.2	M	110	95	100	
			795.3	M	110	100	100	
	795.5	M	110	100	100			
	795.6	F	110/110	100/100	100/100			
	795.7	M	110	100	100			
	795.8	M	110	95	100			
	795.9	F	110/110	<b>100/100</b>	<b>100/100</b>			
	795.10.	F	110/110	<b>95/95</b>	<b>105/100</b>			
		Mãe	110/110	100/95	100/100			
		Pai	110	<b>100 e 95</b>	<b>105 e 100</b>			
	812.1	M	110	100	100			
	812.2	M	110	110	100			
	812.3	F	<b>110/100</b>	<b>110/95</b>	100/100			
	812.5	M	110	100	100			
	812.6	M	110	110	100			
	812.7	M	110	100	100			
	812.8	F	110/110	110/110	100/100			
		Mãe	110/110	110/100	100/100			
		Pai	<b>110 e 100</b>	<b>110 e 95</b>	100			
	830.1	M	110	95	100			
	830.2	M	110	95	100			
	830.3	M	110	100	100			
	830.4	F	110/110	100/100	100/100			
	830.5	F	110/110	95/95	100/100			
	830.6	M	110	95	100			
	830.7	M	110	95	100			
	830.8	F	110/110	<b>95/95</b>	100/100			
	830.9	F	110/110	<b>100/100</b>	100/100			
	830.10.	M	110	100	100			
		Mãe	110/110	100/95	100/100			
		Pai	110	<b>100 e 95</b>	100			
	1588.1	M	110	95	100			
	1588.3	F	110/100	<b>95/95</b>	100/100			
	1588.4	M	110	100	100			
	1588.6	F	110/100	95/95	100/100			
	1588.7	F	110/110	<b>100/100</b>	105/100			
		Mãe	110/100	100/95	100/100			
		Pai	110	<b>100 e 95</b>	100			

**Tabela XI.** Ninhos em que os fenótipos aloenzimáticos observados indicam associação de fêmeas e/ou usurpação de ninhos das espécies de *Trypoxylon* amostradas em Araras – SP.

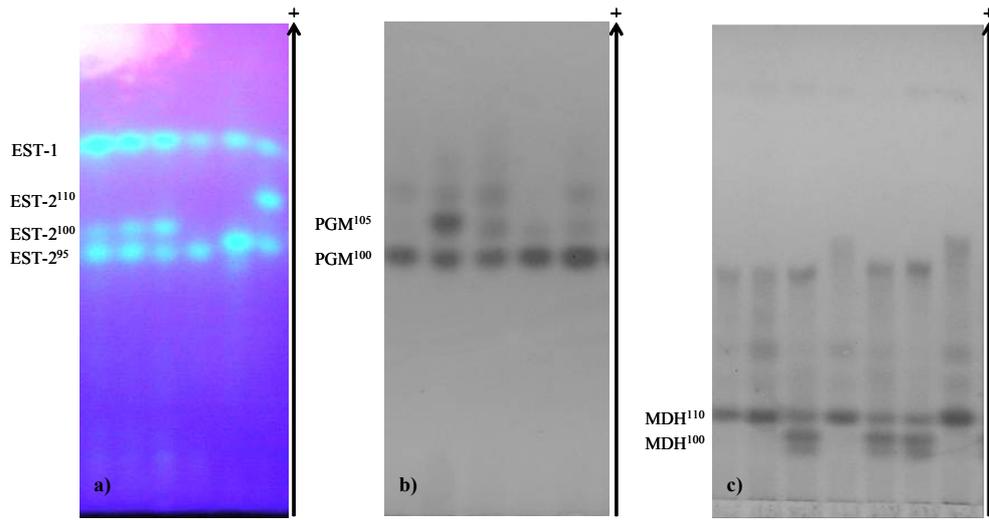
<i>Espécie</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sexo</i>	<b>EST-2</b>	<b>PGM</b>	<b>ICD</b>	<b>MDH</b>
<i>T. aurifrons</i>	445.1	M	110	95	102	
	445.2	F	<b>100/85</b>	100/95	102/100	
	445.3	F	<b>110/110</b>	100/100	102/102	
	445.4	F	<b>105/105</b>	100/95	102/102	
	445.5	F	110/100	100/95	102/102	
	445.6	F	105/100	100/95	102/102	
<i>T. lactitarse</i>	724.2	M	95	100		100
	724.3	M	<b>95</b>	100		100
	724.4	M	100	100		110
	724.5	F	95/95	100/100		110/110
	724.6	F	110/110	100/100		110/100
	724.7	M	<b>100</b>	100		110
	724.8	F	110/110	100/100		110/110
	724.9	M	<b>110</b>	100		110/100
	850.1	M	<b>110</b>	100		110
850.2	M	<b>100</b>	100		110	
850.3	M	<b>95</b>	100		110	
850.4	F	110/95	100/100		110/100	
850.5	F	95/95	100/100		110/100	
850.6	M	95	100		110	
850.1	M	110	100		110	



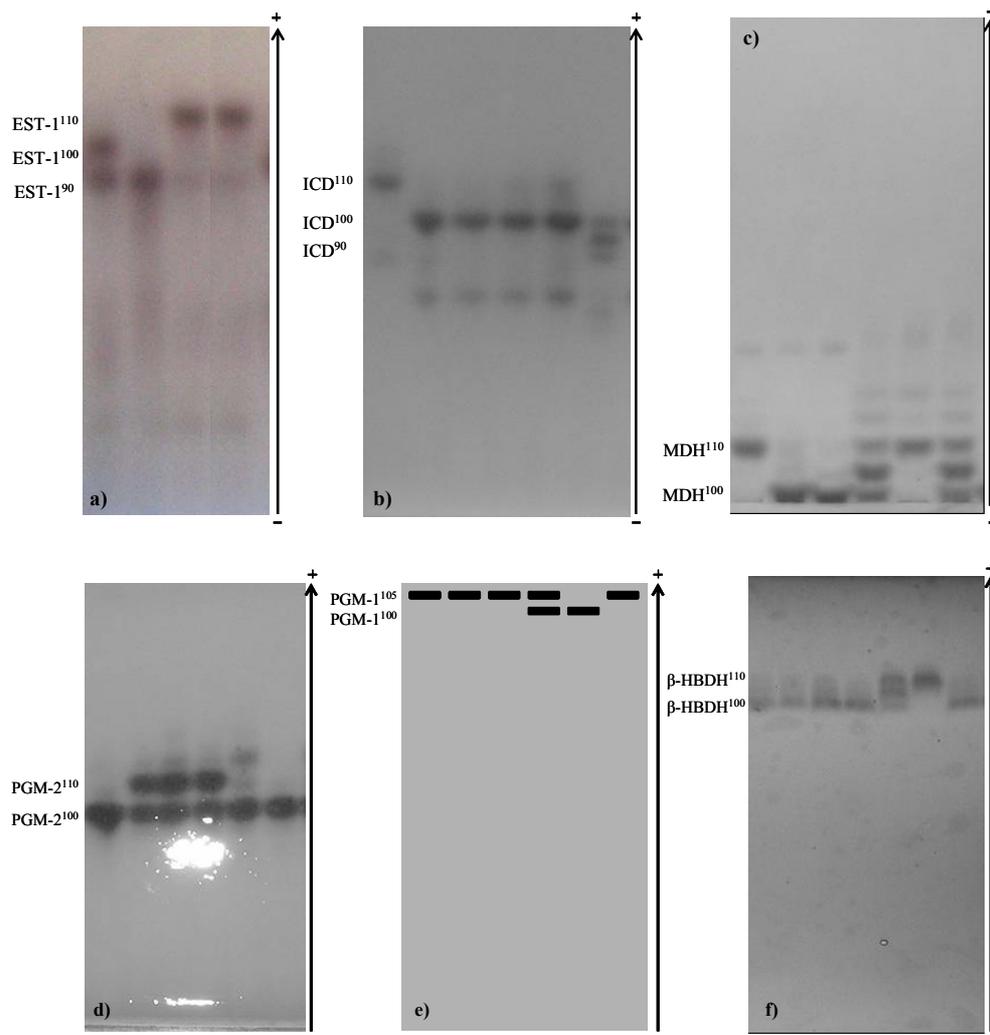
**Figura 1.** Padrão eletroforético de a) esterase, b) fosfoglicomutase, e c) isocitrato desidrogenase em extratos de *Trypoxylon aurifrons* obtido em gel de amido em tampão tris-citrato pH 7,5.



**Figura 2.** Padrão eletroforético de a) esterase, b) fosfoglicomutase e c) isocitrato desidrogenase em extratos de *Trypoxylon nitidum* obtido em gel de amido em tampão tris-citrato pH 7,5.



**Figura 3.** Padrão eletroforético de a) esterase, b) fosfoglicomutase e c) malato desidrogenase em extratos de *Trypoxylon lactitarse* obtido em gel de amido em tampão tris-citrato pH 8,0.



**Figura 4.** Padrão eletroforético de a) esterase, b) isocitrato desidrogenase, c) malato desidrogenase, d) fosfoglicomutase-2, e) fosfoglicomutase-1 e f) beta-hidroxi butirato desidrogenase em extratos de *Trypoxylon rogenhoferi* obtido em gel de amido em tampão tris-citrato pH 7,5.

#### 4.6 Caracterização do DNA mitocondrial de *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum* (Hymenoptera: Crabronidae)

##### 4.6.1 Introdução

O DNA mitocondrial das células animais é uma molécula circular, de fita dupla, pequena, podendo variar de 6 Kb a 2000Kb (Brown 1983; Nahum 2001; Palmer *et al.* 2000; Parker *et al.* 1998), tendo uma estrutura simples (não possui DNA repetitivo, transposons, íntrons ou pseudogenes). É um genoma haplóide, possui herança materna, não apresenta recombinação. Esta molécula possui altas taxas de substituição, de inserções e deleções, que fazem com que seqüências mitocondriais modifiquem-se de forma mais rápida do que seqüências nucleares, tendo assim altas taxas de evolução (Ballard e Whitlock 2004; Hurst e Jiggins 2005; Moritz *et al.* 1987; Sbisá *et al.* 1997). Estas características fazem do mtDNA uma molécula extremamente útil para as análises de alta resolução do processo evolutivo.

O conteúdo em termos de genes é extremamente conservado, cerca de 90% do genoma consiste de regiões codificantes, apresentando dois genes para subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 para os RNA transportadores (tRNA), três para as subunidades da enzima citocromo oxidase (COI, II e III), um para o citocromo B, dois para as subunidades da ATPase (6 e 8) e sete para as subunidades da NADH desidrogenase. Existindo também uma região não-codificadora, rica em A+T nos invertebrados, responsável pela origem da replicação e transcrição da molécula (Moritz *et al.* 1987; Nahum 2001) (Figura 1).

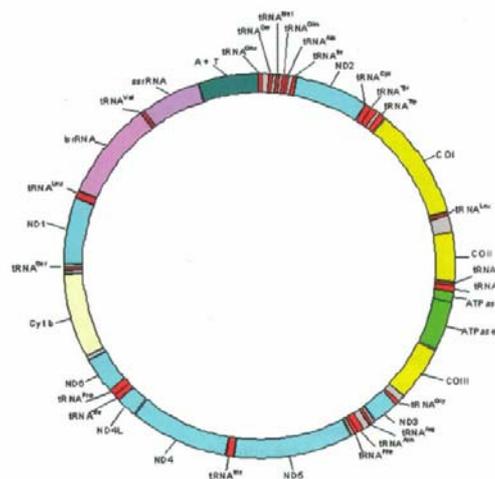


Figura 1. Representação do DNA mitocondrial de *Apis mellifera*. Fonte: <http://inapicoltura.org>

Algumas de suas seqüências são extremamente conservadas. Assim, comparações de genótipos nucleares e mitocondriais podem ajudar a reconhecer indivíduos híbridos, acasalamentos preferenciais e efeitos estocásticos sobre variantes para os quais o táxon ancestral era polimórfico, podendo-se gerar inferências filogenéticas (Sunnucks 2000).

Por outro lado, muitas seqüências do genoma nuclear constituem uma fonte rica de marcadores genéticos devido ao alto grau de variabilidade que possuem. Dessa forma, esses marcadores vêm proporcionando avanços no estudo de genética de populações (Arias e Infante-Malachias 2001; Pereira 2000).

Este trabalho teve como objetivo amplificar o genoma mitocondrial de *Trypoxylon nitidum*, a partir da utilização de *primers* heterólogos e apresentar algumas seqüências de parte deste genoma.

#### 4.6.2 Material e Métodos

**Amostras e Extração de DNA.** Foram amostrados 18 indivíduos de *T. nitidum*, coletados por meio de ninhos-armadilha em duas regiões do estado de São Paulo: 13 em Araras (22°18'S, 47°22'W, 629 m) e cinco em São Carlos (22°01'S, 47°53'W, 850 m).

A extração total do DNA seguiu o protocolo de Sheppard e McPheron (1991), com pequenas modificações, como o acréscimo de 1 µl de proteinase K (20mg/ml) por 200 µl de solução. Esse protocolo é baseado em extrações sucessivas com fenol e clorofórmio, e apresenta um rendimento muito maior por tórax macerado, bem como uma maior quantidade do DNA obtido.

**Amplificação por PCR (“Polymerase chain reaction”).** Para a amplificação do genoma mitocondrial foram utilizados *primers* universais derivados de insetos (“UBC Insect Mitochondrial DNA Primers Kit”) (Simon *et al.*, 1994) e outros desenhados no laboratório de Genética e Evolução de Abelhas (Tabela I). Foram amplificados fragmentos que compreendem os genes: *cytB*, *ND2*, *COI*, *COII* e *16S*.

**Tabela I.** Pares de *primers* testados para a amplificação do genoma mitocondrial via PCR de *Trypoxylon nitidum*, suas localizações (genes onde se ancoram), seqüências e referências bibliográficas.

<b>Código</b>	<b>Nome</b>	<b>Seqüência (5'→3')</b>	<b>Referência</b>	<b>Genes Principais</b>
A	mtD 2 mtD 9	GCTAAATAAGCTAACAGGTTTCAT CCCGGTAATAATTAATAATAAACTTC	(Simon <i>et al.</i> 1994)	ND2, COI
B	COI-IIF mtD18	TCTATACCACGACGTTATTC CCACAAATTTCTGAACATTGACCA	(Hall e Smith 1991) (Simon <i>et al.</i> 1994)	COII
C	mtD19 mtD 22	GAAATTTGTGGAGCAAATCATAG TCAACAAAGTGTCTAGTATCA	(Simon <i>et al.</i> 1994)	ATPases 8 e 6, COIII
D	Seq 18 8467 F	GAACTATCAATTTGATATTG GGAATTTTTTTTTGAATGAAA	(Francisco <i>et al.</i> 2001)	ND3, ND5
E	mtD 24 mtD 28	GGAGCTTCAACATGAGCTTT ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	(Simon <i>et al.</i> 1994)	ND4, ND6, cytB
F	mtD 26 mtD 30	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC ATTCAGGATCGTAAAGGTCC	(Simon <i>et al.</i> 1994)	cytB, ND1
G	Mel 3 16S F	TAAAGTTAAAAAAGCAACTC CACCTGTTTATCAAAAACATGTCC	(Francisco <i>et al.</i> 2001) (Hall e Smith 1991)	ND1, 16S
H	16S R mtD 36	CGTCGATTTGAACTCAAATCATG AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	(Hall e Smith 1991) (Simon <i>et al.</i> 1994)	16S, 12S
I	mtD 8 mtD 12	CAACATTTATTTTGATTTTTGG TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	(Simon <i>et al.</i> , 1994)	COI
J	Seq 21 Mel 2	CTATTAACAATTGGTCATC TGGAAAAATAATAATTG	(Silvestre e Arias, não publicado)	COI
K	mtD 35 mtD 3	AAGAGCGACGGGCGATGTGT TGGGGTATGAACCCAGTAGC	(Simon <i>et al.</i> 1994)	A+T
L	AMB 01 AMB 02	TGATAAAAGAAATATTTTGA CATGATCCTGGGGTACTT	(Arias <i>et al.</i> 1998)	ND2
M	8321 R mtD 23	TTATATATCTAATTCTAT GCTAATATAGCAGCTCCTCC	(Silvestre e Arias, não publicado) (Simon <i>et al.</i> 1994)	ND4
N	mtD 24 mtD 27	GGAGCTTCAACATGAGCTTT CCCTCAGAATGATATTTGCTCTCA	(Simon <i>et al.</i> 1994)	ND4, ND6
O	AMB 19 16S F	AAATCCAAATCAAGGATACA CACCTGTTTATCAAAAACATGTCC	(Arias <i>et al.</i> 1998) (Hall e Smith 1991)	ND1, 16S

As reações de PCR foram realizadas num volume total de 50µl, contendo 2,5 µl de tampão de reação *Taq* com KCl; 2,5µl de tampão de *Taq* com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5 µl de dNTPs 2mM de cada; 3,0µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM; 2,5µl de cada *primer* 20 µM; 2,5 U de *Taq*

DNA polimerase (Kit Fermentas); de 1µl de DNA, e o volume final foi completado com H<sub>2</sub>O deionizada e estéril. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguindo para 35 ciclos de: desnaturação a 94°C (1 min); anelamento a 42°C (1 min e 20 seg) e elongação a 64°C (2 min). Por fim, foi realizado um passo extra de extensão a 64°C por 10 min.

Os produtos amplificados foram analisados eletroforéticamente em gel de agarose 0,8%, posteriormente corado com brometo de etídeo. Os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta (UV) e registrados com o auxílio de uma câmara digital Canon.

**Clonagem dos produtos de PCR e identificação dos plasmídeos recombinantes.** Os fragmentos resultantes da reação de PCR foram ligados em plasmídeo específico: pGem-T Easy Vector System (PROMEGA). As reações seguiram as instruções do fabricante. Para obter um DNA mais limpo e concentrado, foi realizada uma precipitação do DNA: 40 µl do produto de PCR foram precipitados com 10 µl de acetato de amônio 7,5 M (temperatura ambiente) e 100 µl de etanol absoluto (temperatura ambiente). Esta mistura foi deixada por 5 min., à temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugado a 12000 rpm por 5 min., à temperatura ambiente, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 100 µl de etanol 70 %, e em seguida centrifugado a 12000 rpm por 5 min. Por fim, o precipitado foi seco à vácuo e ressuscitado em 10 µl de 1X TE (10mM Tris e 1mM EDTA), dos quais 3 µl foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% para uma quantificação visual antes de montar as ligações.

A preparação de células competentes de *Escherichia coli* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Estas células foram posteriormente transformadas com os plasmídeos recombinantes de acordo com o seguinte protocolo: 100 µl de células foram incubados com 30 ng de plasmídeo recombinante por 15 min. no gelo, em seguida a 37 °C por 5 min. e por mais 15 min. no gelo; 250 µl de meio LB foram acrescentados (à temperatura ambiente); seguiu-se uma incubação a 37 °C sob agitação por uma hora; as células foram plaqueadas em meio LB-ágar com ampicilina (0,15 mg/ml) e X-Gal (0,10 mg/ml) e incubadas durante a noite a 37°C. Em média, 10 colônias brancas (contendo plasmídeo recombinante) de cada transformação foram inoculadas em 5 ml de meio LB e incubadas durante a noite a 37°C sob agitação.

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos por meio de minipreps de acordo com o protocolo descrito no manual Automated DNA Sequencing Chemistry Guide da

Perkin Elmer Corporation. Para a certificação do tamanho do inserto, uma alíquota de 10 % do volume de cada miniprep foi digerida com 5 U da enzima de restrição *Eco* RI. Vale observar que os vetores utilizados apresentam dois sítios de restrição para essa enzima, os quais flanqueiam o inserto; assim quando ocorre a digestão, o inserto é isolado do plasmídeo. Após uma hora de digestão, o processo foi interrompido e as digestões submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os géis foram corados com brometo de etídeo e os fragmentos visualizados através de luz ultravioleta (UV). Foram considerados positivos os clones que apresentaram os insertos de tamanho compatível com o produto de PCR correspondente.

**Seqüenciamento automático.** Os clones positivos foram seqüenciados utilizando-se o conjunto de reagentes “Big Dye Terminator v.3.1” (Applied Biosystems) para seqüenciamento automático. Esse conjunto é baseado na incorporação de dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (*dye terminators*). As condições foram otimizadas com o propósito de utilizar apenas 25% da quantidade recomendada de reagentes, e conseqüentemente maximizando o aproveitamento do material. As concentrações de DNA molde e de *primer* seguiram as instruções do fabricante.

As amostras foram analisadas em um seqüenciador automático, modelo ABI-PRISM 3100 (Perkin Elmer). Foram utilizados nas reações os *primers* universais complementares à região do plasmídeo (M13 forward e M13 reverse). Para cada região foram seqüenciadas e alinhadas as duas fitas de DNA de um mínimo de dois clones, para uma maior precisão da seqüência.

**Alinhamento de nucleotídeos.** O alinhamento das seqüências de DNA foi realizado para cada gene individualmente, usando-se o programa de alinhamento CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) e ajustado manualmente.

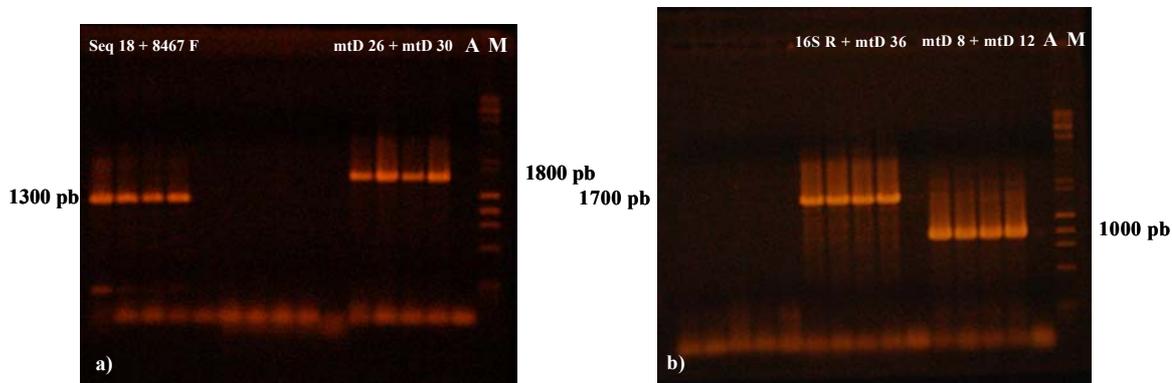
#### 4.6.3 Resultados

Dos 15 pares de *primers* utilizados em *T. nitidum*, sete (B, C, D, F, H, I e L – Código Tabela I) apresentaram padrão de amplificação dos fragmentos de mtDNA. Os fragmentos obtidos apresentaram variações (pb) aos esperados para *A. mellifera* (Tabela II).

**Tabela II.** Tamanho dos fragmentos esperado para *Apis mellifera* e observado em *Trypoxylon nitidum* obtidos pela utilização dos pares de *primers*. O código segue na Tabela I.

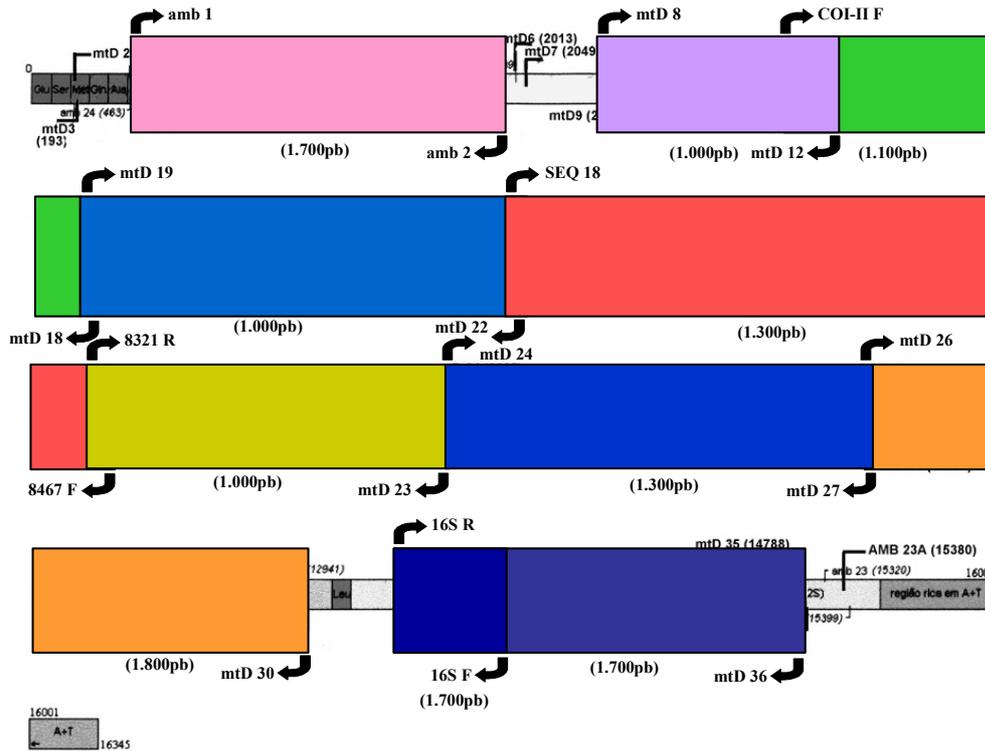
<b>Primers (código)</b>	<b>Tamanho esperado (pb)</b>	<b>Tamanho observado (pb)</b>
B	900	1.100
C	1.700	1.000
D	2.350	1.300
F	1.700	1.800
H	1.800	1.700
I	880	1.000
L	1.700	1.700

A revelação via gel de agarose corado com brometo de etídio dos fragmentos de DNA amplificados via PCR permitiu a visualização do tamanho dos fragmentos de cada região (Figuras 2a e b).



**Figura 2.** Padrão de amplificação dos locos flanqueados pelos *primers*: a) Seq18 + 8467 F e mtD 26 + mtD 30; b) 16S R + mtD 36 e mtD 8 + mtD 12; A = água (controle negativo da PCR); M = marcadores ( $\phi$ X e  $\lambda$ -Hind).

De acordo com o mapa do mtDNA de *A. mellifera* é esperado que as regiões amplificadas em *T. nitidum* tenham a seguinte distribuição (Figura 3). A partir destes resultados, foram escolhidas as regiões C, D, F, H e I (Código Tabela I) do mtDNA de *T. nitidum* para seqüenciamento, no entanto, resultado positivo foi encontrado apenas para as regiões F e H.



**Figura 3.** Mapa do mtDNA de *Apis mellifera* e localização dos *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse em *Trypoxylon nitidum* que apresentaram sucesso (entre parênteses está o tamanho de cada fragmento amplificado).

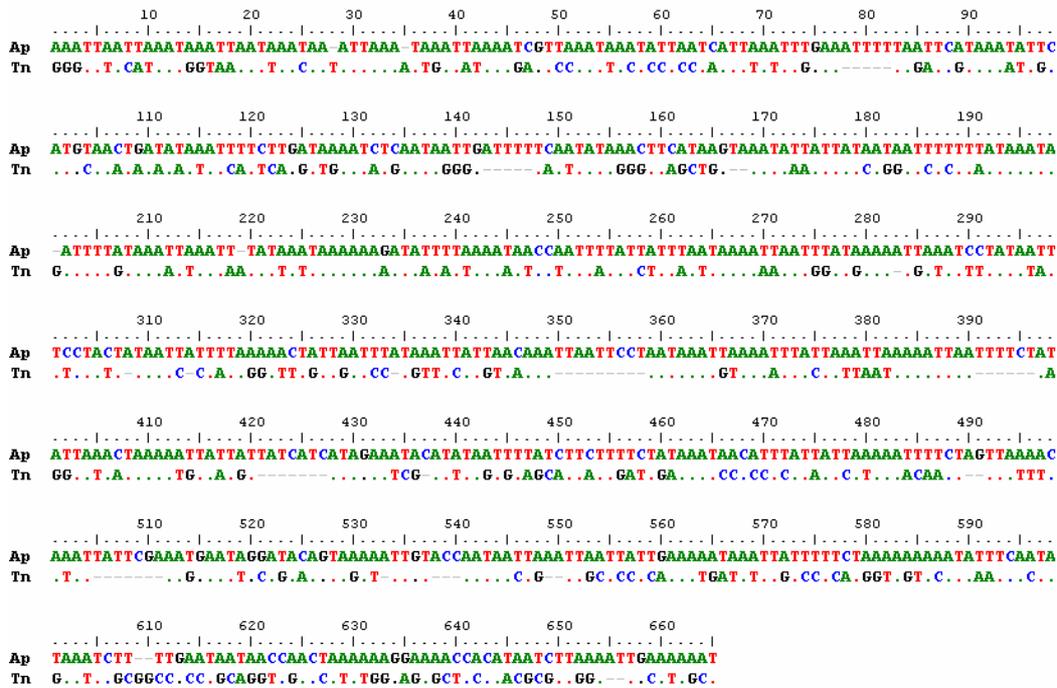
**RNA Ribossômico – Subunidades 16S e 12S (parciais).** Parte do gene do RNA Ribossômico 12S foi estudado a partir da utilização dos pares de primers 16S R + mtD 36 (Código F – Tabela I). Esta região flanqueia parte da região 16S e 12S (Figura 1). A amplificação desta região gerou um fragmento em *T. nitidum* que apresentou 1.700pb. Em *Apis mellifera* o tamanho do fragmento observado é de aproximadamente 1.800pb.

Foram sequenciados cerca de 1.000pb desta região. Esta porção do gene de *T. nitidum* foi alinhada e comparada com *A. mellifera* (Figura 4).



**Cyt B – Citocromo B – e Região ND1 – NADH desidrogenase subunidade 1 – (parciais).** Parte do gene para Cyt B e a região ND1 foram estudados a partir da utilização dos pares de primers mtD 26 + mtD 30. A amplificação desta região gerou um fragmento em *T. nitidum* que apresentou 1.800pb. Em *Apis mellifera* esta região apresenta 1.700pb.

Foram seqüenciados cerca de 600pb desta região. Esta porção do gene de *T. nitidum* foi alinhada e comparada com *A. mellifera* (Figura 5).



**Figura 5.** Análise da região Cyt B+ND1 seqüenciada de *Trypoxylon nitidum*: alinhamento das seqüências de nucleotídeos das espécies Ap (*Apis mellifera*) e Tn (*Trypoxylon nitidum*).

O tamanho dos fragmentos apresentou uma diferença de 48pb para as duas espécies, sendo de *A. mellifera* o maior fragmento. Das 240 substituições, 107 foram sinônimas.

Os genes cyt B e ND1 estão entre os mais conservados do genoma mitocondrial de insetos (Simon *et al.* 1994) e este grande número de substituições foi um achado inesperado.

#### 4.6.4 Discussão

No presente estudo foi verificada a possibilidade de se utilizar *primers* de mtDNA heterólogos universais de insetos para estudos genéticos em *Trypoxylon nitidum*, indicando a possibilidade de se desenvolver marcadores exclusivos para espécies deste gênero.

O DNA mitocondrial tem confirmado ser uma importante ferramenta em estudos populacionais e filogenéticos de insetos (Simon *et al.* 1994). Diversos genes mitocondriais de uma grande variedade de organismos já têm suas seqüências publicadas e os genomas mitocondriais de muitas espécies já foram totalmente seqüenciados e estão dispostos em bancos de dados. Em abelhas, contamos na literatura com a disponibilidade da seqüência completa do mtDNA da abelha *Apis mellifera* (Crozier e Crozier 1993), o seqüenciamento completo de uma abelha sem ferrão, *Melipona bicolor* (Silvestre e Arias, não publicado, GenBank AF466146) e mais recentemente, o seqüenciamento completo do DNA mitocondrial de *Bombus ignitus* (Cha *et al.* 2007). Em vespas não parasitóides, poucos são os trabalhos que relatam seqüências do DNA mitocondrial e nenhum relato é encontrado em *Trypoxylon*.

A literatura que vem sendo reportada abre novas perspectivas para estudos populacionais, filogenéticos e de evolução do comportamento social em himenópteros, além de auxiliar no mapeamento de sítios de restrição e no desenho de *primers* para amplificação de regiões de interesse específico (Arias e Sheppard 1996; Arias e Sheppard 2005; Costa *et al.* 2003; Fernandes-Salomão *et al.* 2002; Raffiudin e Crozier 2007; Silvestre 2002). Esforços adicionais são necessários para que novos dados possam se somar aos aqui apresentados para *Trypoxylon nitidum*, de forma que em breve se possa contar com esta útil ferramenta para estudos de Genética Evolutiva e de Populações deste importante grupo de vespas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Desde que Richards (1934) resumiu a maioria das observações publicadas sobre o gênero *Trypoxylon*, numerosos estudos foram surgindo e, a partir do trabalho de Coville (1982), que resumiu os dados encontrados no subgênero *Trypargilum* das espécies norte-americanas, esforços foram investidos no conhecimento da biologia das espécies de *Trypoxylon* das regiões temperadas.

Características particulares do grupo, tais como sazonalidade, forrageamento, inimigos naturais, arquitetura intranidal, razão sexual, tempo de desenvolvimento e comportamento de adultos são os principais alvos de estudo, os quais têm contribuído para o conhecimento de aspectos ecológicos e evolutivos (padrões de riqueza e abundância, padrão de distribuição temporal e espacial, interações inter- e intra-específicas, estabelecimento de cadeias alimentares, investimento parental, cuidado parental, comportamento social) do gênero *Trypoxylon* e da ordem Hymenoptera.

Um dos aspectos mais interessantes deste gênero é o fato dos machos permanecerem junto ao ninho enquanto a fêmea fundadora está forrageando. Do ponto de vista evolutivo, este comportamento, muito raro entre os himenópteros, além de proteger a prole contra parasitóides e outros inimigos naturais, pode assegurar ao macho a paternidade da prole feminina.

Até o momento, a maioria dos estudos em *Trypoxylon* buscou estudar a biologia de nidificação destas espécies e poucas são as que buscaram estabelecer o significado funcional do comportamento de macho-guarda (Coville e Coville 1980; Brockmann 1992; Brockmann e Grafen 1989). Apenas Peruquetti (2003), utilizando marcadores genéticos, objetivou investigar a associação deste comportamento e a garantia da paternidade.

O presente trabalho relata dados sobre a biologia de nidificação de espécies de *Trypoxylon* que ainda não eram conhecidos na literatura (*T. aurifrons* e *T. nitidum*) e contribui com novas informações sobre espécies já estudadas (*T. rogenhoferi* e *T. lactitarse*). Podem ser citadas as seguintes contribuições para o conhecimento das vespas do gênero *Trypoxylon*:

- Dados sobre a sazonalidade, distribuição espacial, forrageamento e inimigos naturais de quatro espécies de *Trypoxylon* coletadas em três regiões do estado de São Paulo. Foram verificados padrões de distribuição e forrageamento espécie-específicos e inimigos naturais

comuns. Os dados produzidos sugerem a ocorrência de competição aparente entre as espécies deste grupo;

- Aspectos da biologia de nidificação e arquitetura intranidal de *T. aurifrons*, espécie pouca conhecida da literatura;
- Descrição dos tipos de pupários de *T. rogenhoferi* e *T. lactitarse* e verificação do efeito do diâmetro do tubo e do sexo na sua determinação;
- Informações para as quatro espécies de *Trypoxylon* sobre o dimorfismo sexual, a razão sexual e fatores que afetam seu desvio. Verificação do investimento parental sazonal, da herdabilidade para tamanho de corpo e sua possível relação com o sucesso reprodutivo;
- Caracterização dos padrões de alozimas de espécies ainda não estudadas geneticamente (*T. lactitarse*, *T. aurifrons* e *T. nitidum*). Com esta metodologia, foi possível verificar que, embora a maioria dos ninhos apresentem progênes que se ajustam a um padrão de monogamia/monandria, foi observado ninhos com acasalamentos extra-par.

Desta forma, concluímos que fatores sazonais apresentam grande influência sobre os aspectos da biologia de nidificação de *T. rogenhoferi*, *T. lactitarse*, *T. aurifrons* e *T. nitidum* - estas espécies nidificam preferencialmente na estação quente-chuvosa. Foi visto que o padrão de distribuição espacial destas espécies pode ser definido por uma competição aparente, mediada pela existência de inimigos naturais comuns, uma vez que estas não competem por presas e tubos para nidificação. A razão sexual destas espécies não difere de 1:1 e, sendo as fêmeas significativamente maiores que os machos, maior alocação de recursos é desviada para este sexo nas quatro espécies estudadas. Além disso, a observação de que qualidade e quantidade da prole mostraram-se associadas, é um resultado importante a ser explorado em trabalhos futuros. Por fim, as análises genéticas indicaram a influência do método de coleta sobre a estrutura populacional, a existência de machos diplóides e acasalamentos extra-par.

Diante destes achados, este trabalho abre perspectivas para estudos subseqüentes, que exigirão a utilização de metodologias mais adequadas para responder questões ainda não esclarecidas em *Trypoxylon*:

- O acompanhamento diário da nidificação será requerido para responder as questões sobre o tempo de construção do ninho e o tempo de desenvolvimento dos imaturos. Além disso, a observação, marcação e captura dos parentais esclarecerão acerca da alocação de recursos destas espécies, contribuindo para a estimativa da herdabilidade para tamanho de corpo por meio de regressão linear entre parentais e progênie e verificando a relação existente entre quantidade e qualidade da prole. Estes métodos permitirão ainda verificar o comportamento de machos e fêmeas durante a nidificação.
- A utilização de outros marcadores genéticos, como o DNA mitocondrial, permitirá verificar a estrutura da população destas vespas, caracterizando comportamentos de dispersão ou filopatria. Além disso, análises de parentesco por marcadores mais eficientes, como microssatélites espécie-específicos, permitirão estabelecer a genética da prole e dos respectivos parentais.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.M.L.; GARÓFALO, C.A. Nesting biology of *Centris (Hemisiella) tarsata* (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.21, p. 477–486, 2004.
- AKÇAY, E.; ROUGHGARDEN, J.. Extra-pair paternity in birds: review of the genetic benefits. **Evolutionary Ecology Research** v.21, p. 855–868, 2007.
- ALCOCK, J. Social interactions in solitary wasp, *Cerceris simplex* (Hymenoptera: Sphecidae). **Behaviour**, v.54, p. 142–152, 1975.
- ALCOCK, J. The relation between female body size and provisioning behavior in the bee *Centris pallida* Fox (Hymenoptera: Anthophoridae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.52, p. 623–632, 1979.
- ALCOCK, J. **Animal behavior, an evolutionary approach**. 5.ed. Sunderland: Sinauer, 1983. 625 p.
- ALCOCK, J. Adaptive mate-guarding by males of *Ontholestes cingulatus* (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Insect Behavior**, v.4, p. 763–771, 1991.
- ALCOCK, J. Provisional rejection of three alternative hypotheses on the maintenance of a size dichotomy in Dawson's burrowing bee (*Amegilla dawsoni*) (Apidae, Apinae, Anthophorini). **Behavioral Ecology and Sociobiology** v.39, p. 181–188, 1996.
- 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.
- ALCOCK, J.; SIMMONS, L.W.; BEVERIDGE, M. Seasonal change in offspring sex and size in Dawson's burrowing bees (*Amegilla dawsoni*) (Hymenoptera: Anthophorini). **Ecological Entomology**, v.30, p. 247–254, 2005.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574 p.
- AMARANTE, S.T.P. **Biologia e comportamento reprodutivo de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* F. (Hymenoptera: Sphecidae)**. 1991. 109 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Museu de Zoologia de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.
- AMARANTE, S.T.P. A synonymic catalog of the Neotropical Crabronidae and Sphecidae (Hymenoptera:Apoidea). **Arquivos de Zoologia**, v.37, p.1–139, 2002.
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, Sérgio (Org.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.143–152.
- ARIAS, M.C.; SHEPPARD, W.S. Variação intraespecífica em abelhas *Apis mellifera*

determinada através de análise de DNA mitocondrial. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 2., 1996, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, Editora: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 1996. p. 96.

ARIAS, M.C.; SHEPPARD, W.S. Phylogenetic relationship of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.37, p. 25-35. 2005.

Arias, M. C., F. O. Francisco, D. Silvestre, R. Weinlich e W. S. Sheppard. Utilização de primers específicos para a amplificação integral do genoma mitocondrial de abelhas *Apis mellifera*. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 3., 1998, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, Editora: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 1998. p. 271.

ASSIS, J.M.F.; CAMILLO E. Diversidade, sazonalidade e aspectos biológicos de vespas solitárias (Hymenoptera: Sphecidae: Vespidae) em ninhos-armadilha na região de Ituiutaba, MG. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, p. 335-347, 1997.

AVERY, P.J. The population genetics of haplo-diploid and x-linked genes. **Genetic Research**, v 44, p. 231-341, 1984.

AVISE, J.C. Systematic value of electrophoretic data. **Systematic Zoology**, v.23, p. 465-481, 1974.

AYRES, M. et al. **BioEstat 4.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2005. 324 p.

BALLARD, J.W.O.; WHITLOCK, M.C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v.13, p. 729-744, 2004.

BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. **Ecology**: individuals, populations and communities. 4.ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltda, 2006. 738 p.

BATEMAN, A.J. Intra-sexual selection in *Drosophila*. **Heredity**, v.2, p. 349-368, 1984.

BOATO, A.; BATTISTI, A. High genetic variability despite haplodiploidy in primitive sawflies of the genus *Cephalcia* (Hymenoptera: Pamphiliidae). **Experientiae**, v.52, p. 512-521, 1996.

BOHART, R.M.; MENKE, A.S. **Sphecidae wasps of the world**: a generic revision. Berkeley: University of California Press, 1976. 695 p.

BOOSMA, J.J. J.; ISAAKS A. Energy investment and respiration in queens and males of *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.18, p. 19-27, 1985.

BORASCHI, D.; PERUQUETTI, R.C.; DEL LAMA, M.A.. Biologia, comportamento social e alocação sexual de *Digelasinus diversipes* (Kirby, 1882) (Hymenoptera, Argidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.49, p. 253-263, 2005.

- BOSCH, J.; VICENS, N. Sex allocation in the solitary bee *Osmia cornuta*: do females behave in agreement with Fisher's theory? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.29, p. 124–132, 2005.
- BRABY, M.F.; JONES, R.E. Reproductive patterns and resource allocation in tropical butterflies: influence of adult diet and seasonal phenotype on fecundity, longevity and egg size. **Oikos**, v.72, p. 55–59, 1995.
- 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.; 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.
- BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: NEI, M.; Koehn, R. (Eds.). **Evolution of genes and proteins**. Sinauer: Sunderland, 1983. p. 62-88.
- BUDRINE, A., BUDRYS, E.; NEVONITRE, Z. Solitary Hymenoptera Aculeata inhabiting trap-nests in Lithuania: nesting cavity choice and niche overlap. **Latvijas Entomologs**, v.41, p. 19–31, 2004.
- BUSCHINI, M.L.T. Life-history and sex allocation in *Trypoxylon (syn. Trypargilum) lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae). **Journal of Zoological Systematics e Evolutionary Research**, v.45, p. 206–213, 2007.
- BUSCHINI, M.L.T.; WOLFF, 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.
- BUSCHINI, M.L.T.; WOLFF, L.L.; NIESING, F. Nesting biology of *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* (Hymenoptera; Crabronidae) in trap-nests in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.66, p. 161–171, 2006.
- 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) lactitarse* Saussure e *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae) em ninhos-armadilha, com especial referência a suas presas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, p. 251–262, 1999.

- 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.; 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. Biological observations on *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *lactitarse* Saussure in Southeastern Brazil (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.37, p. 769–778, 1993.
- CAMILLO, E. et al. Diversidade e abundância sazonal de abelhas e vespas solitárias em ninhos-armadilha (Hymenoptera, Apocrita, Aculeata). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 39, p. 459–470, 1995.
- CHA, S.Y. et al. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignites* (Hymenoptera: Apidae). **Gene**, v. 392, p. 206–220, 2007.
- CHAPMAN, T.W.; STEWART, S.C. Extremely high levels of inbreeding in a natural population of the free-living wasp *Ancistrocerus antislope* (Hymenoptera: Vespoidea: Eumeninae). **Heredity**, v.76, p. 65–69, 1996.
- CHARNOV, E.L. The genetical evolution of patterns of sexuality: Darwinian fitness. **American Naturalist**, v.113, p. 465–480, 1979.
- CHARNOV, E.L. **The theory of sex allocation**. Princeton: Princeton University Press. 1982. 480 p.
- CLARK, A.B. Sex ratio and local resource competition in a prosimian primate. **Science**, v.201, p. 163–165, 1978.
- COOK, J.M. Sex determination in Hymenoptera: a review of models and evidence. **Heredity**, v.71, p. 421–435, 1993.
- COSTA, M.A. et al. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. **Apidologie**, v.34, p. 73–84, 2003.
- 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 Entomology**, v.57, p. 332–340, 1981. 1981.
- COVILLE, R. E. **Wasps of the genus *Trypoxylon* subgenus *Trypargilum* in North America**. Berkeley: University of California Press, 1982. 147.
- COVILLE, R.E.; GRISWOLD, C. Nesting biology of *Trypoxylon xanthandrum* in Costa Rica with observation on its spider prey (Hymenoptera: Sphecidae; Araneae: Senoculidae). **Journal**

of the **Kansas Entomological Society**, v.56, p. 205–216, 1983.

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.

COWAN, D.P. Parental investment in two solitary wasps *Ancistrocerus adiabatus* and *Euodynerus foraminatus* (Eumenidae: Hymenoptera). **Behavior Ecology and Sociobiology**, v.9, p. 95–102, 1991.

CRESPI, B.J. Heterozygosity in the haplodiploid Thysanoptera. **Evolution**, v.45, p. 458–464, 1991.

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

CROZIER, R.H. Heterozygosity and sex determination in haplodiploidy. **American Naturalist**, v.105, p. 399–412, 1971.

CROZIER, R.H.; CROZIER, Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and the genome organization. **Genetics**, v.133, p. 97–117, 1993.

DANFORTH, B.N. Provisioning behaviour and the estimation of investment ratios in a solitary bee, *Calliopsis* (*Hypomacrotera*) *persimilis* (Cockerell) (Hymenoptera: Andrenidae). **Behavior Ecology and Sociobiology**, v.27, p. 159–168, 1990.

DIETRICH, B.; WEHNER, R. Sympatry and allopatry in two desert ant sister species: how do *Cataglyphis bicolor* and *C. savignyi* coexist? **Oecologia**, v.136, p. 63–72, 2003.

ERWIN, T.L. The tropical forest canopy: the heart of biotic diversity. In: WILSON, E.O.; PETER, F.M. **Biodiversity**. Washington D.C.: National Academy Press, 1986. p. 123–129.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. 3<sup>rd</sup>ed. New York: Longman, 1989. 389 p.

FERNANDES-SALOMÃO, T.M. et al. Mitochondrial and nuclear DNA characterization in the *Melipona* species (Hymenoptera, Meliponini) by RFLP analysis. **Hereditas**, v.137, p. 229–233, 2002.

FISHER, R.A. **The genetical theory of natural selection**. New York: Dover Publications, 1958. 318 p.

FLANDERS, S.E. The mechanisms of sex-ratio regulation in the (Parasitic) Hymenoptera. **Insectes Sociaux**, v.3, p. 325–334, 1956.

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

FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D.; ARIAS, M.C. Mitochondrial DNA characterization of five species of *Plebeia* (Apidae: Meliponini): RFLP and restriction maps. **Apidologie**, v.323,

p. 323–332, 2001.

FREEMAN, B.E. Parental investment, maternal size and population dynamics of a solitary wasp. **American Naturalist**, v.117, p. 357–362, 1981.

FROHLICH, D.R.; TEPEDINO, V.J. Sex ratio, parental investment, and interparent variability in nesting success in a solitary bee. **Evolution**, v.40, p. 142–151, 1986.

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.

GARNERY, L.; CORNUET, J.M.; SOLIGNAC, M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. **Molecular Ecology**, v.1, p.145–154, 1992.

GASTON, K.J. The magnitude of global insect species richness. **Conservation Biology**, v.5, p. 283–296, 1991.

GAULD, I.D.; BOLTON, B. (Eds.) **The Hymenoptera**. (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Oxford University Press, 1996. 839 p.

GENARO, J.A. Sobre la nidificación de *Sceliphron caementarium* y primer registro de *Trypoxylon texense* para Puerto Rico. **Caribbean Journal of Science**, v.32, p. 243–244, 1996a.

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

GOULET, H.; HUBER, J.T. (Eds.). **Hymenoptera of the world: an identification guide to families**. Ontario: Center for Land and Biological Resources Research, 1993. 668 p.

GRAY, E.M. Female red-winged blackbirds accrue material benefits from copulating with extra-pair males. **Animal Behavior**, v.53, p. 625–639, 1997.

GRIMALD D.A.; ENGEL, M.S. **Evolution of the Insects**. New York: Cambridge University Press, 2005. 755 p.

GRISSEL, E. Hymenopteran biodiversity: some alien notions. **American Entomologist**, v.45, p. 235–244, 1999.

HALL, H.G.; SMITH D.R. Distinguishing african and european honeybee matriline using amplified mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.88, p. 4548–4552, 1991.

HAMILTON, W.D. Extraordinary sex ratios. **Science**, v.156, p. 477–488, 1967.

HANSON, P.E.; MENKE, A.S. The Sphecid Wasps (Sphecidae). In: HANSON, P.E.; GAULD, I.A. (Eds.). **The Hymenoptera of Costa Rica**. New York: Oxford University Press, 1995. p. 621–649.

- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. **Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics**. Amsterdam: North-Holland Publisher, 1976. 630 p.
- HAVRON, A. et al. 1987. Selection on the male hemizygous genotype in arrhenotokous insects and mites. **Entomophaga**, v.32, p. 261-268, 1976.
- HERRE, E.A. Optimality, plasticity and selective regime in fig wasp sex ratios. **Nature**, v.329, p. 627-629, 1987.
- HOLT, R.D. Community modules. In: GANGE, A.C.; BROWN V.K. (Eds.). **Multitrophic interactions in terrestrial systems**. Oxford: Blackwell Science, 1977. p. 333-349.
- HOOGLUND, J.L. Why do female Gunnison's prairie dogs copulate with more than one male? **Animal Behavior**, v.55, p. 351-59, 1998.
- HUGHES, W.O.H.; BOOMSMA, J.J. Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. **Evolution**, v.58, p. 1251-1260, 2004.
- HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, v.125, p. 1294-1295, 1957.
- HURST, G.D.D.; JIGGINS, F.M. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. **Biological Sciences**, v.272, p.1525-1534, 2005.
- HUTCHINSON, E.S. et al. The genetics of the diploidized tetraploid *Avena barbata*. **The Journal of Heredity**, v.74, p. 325-330, 1983.
- JAYASINGH D.B.; TAFFE, C.A. The biology of the eumenid mud-wasp *Pachodynerus nasidens* in trapnests. **Ecological Entomology**, v.7, p. 283-289, 1982.
- JEFFRIES, M.J.; LAWTON, J.H. Enemy free space and the structure of ecological communities. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.23, p. 269-286, 1984.
- JOHNSON, M.D. The relationship of provision weight to adult weight and sex ratio in the solitary bee *Ceratina calcarata*. **Ecological Entomology**, v.13. p. 165-170, 1988.
- KEMPENAERS, B.; LANCTOT, R.B.; ROBERTSON, R.J. Certainty of paternity and parental investment in eastern bluebirds and tree swallows. **Animal Behaviour**, v.55, p. 845-860, 1998.
- KIM, J.Y.; THORP, R.W. Maternal investment and size-number trade-off in a bee, *Megachile apicalis*, in seasonal environments. **Oecologia**, v.126, p. 451-546, 2001.
- KLOSTERMEYER, E.C.; JR-MECH, S.J.; RASMUSSEN, W.B. Sex and weight of *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae) progeny associated with provision weights. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.46, p. 536-548, 1973.
- KONIOR, M.; RADWAN, J.; KOLODZIEJCZY, M. Polyandry increases offspring

fecundity in the bulb mite. **Evolution**, v.55, p.1893–1896, 2001.

KROMBEIN, K.V. **Trap-nesting wasps and bees**. Life histories, and associates. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1967. 570 p.

KUKUK, P.F.; SAGE, G.K. Reproductivity and relatedness in a communal halictine bee *Lasioglossum (Chialictus) hemichalceum*. **Insects Sociology**, v.41, 443–455, 1994.

LASALLE, J.; GAULD, I.D. **Hymenoptera and Biodiversity**. Washington DC: CAB International, 1993. 368 p.

LESTER, L.J.; SELANDER, R.K. Population genetics of haplodiploid insects. **Genetics**, v.92, p. 1329–1345, 1979.

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.

MARTINS, R.P. et al. Seasonal variation in the sex allocation of a neotropical solitary bee. **Behavior Ecology**, v.10, p. 401–408, 1999.

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. 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: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000. p. 85-130. (Série Oecologia Brasiliensis).

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

MOLUMBY, A. Dynamics of parasitism in the organ-pipe wasp, *Trypoxylon politum*: effects of spatial scale on parasitoid functional response. **Ecological Entomology**, v.20, p. 159–168, 1995.

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

MÖNKKÖNEN, M. et al. Heterospecific attraction affects community structure and migrant abundances in northern breeding bird communities. **Canadian Journal of Zoology**, v.75, p. 2077–2083, 1997.

MORATO, E.F.; MARTINS, R.P. An overview of proximate factors affecting the nesting behavior of solitary wasps and bees (Hymenoptera: Aculeata) in preexisting cavities in wood. **Neotropical Entomology**. v.35, p. 285–298, 2006.

- MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p. 269–292, 1987.
- MORRIS, R.J.; MÜLLER, C.B.; GODFRAY, H.C.J. Field experiments testing for apparent competition between primary parasitoids mediated by secondary parasitoids. **Journal of Animal Ecology**, v.70, p. 301–309, 2001.
- MORRIS, R.J.; LEWIS, O.T.; GODFRAY, H.C.J. Experimental evidence for apparent competition in a tropical forest food web. **Nature**, v.428, p. 310–313, 2004.
- NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.82-96.
- OKU, S.; NISHIDA, T. Factors affecting female-biased sex ratio in trap nesting wasp, *Trypoxylon malaisei*. **Researches on Population Ecology**, v.41, p. 169–175, 1999.
- OLDROYD, B.; MORAN, C. Heritability of worker characters in the honeybee (*Apis mellifera*). **Australian Journal of Biology Science**, v.36, p. 323–332, 1983.
- O'NEILL, K.M. **Solitary Wasps: Behavior and Natural History**. Ithaca: Cornell University Press, 2001. 406 p.
- OLSSON, M. et al. Can female adders mate multiply? **Nature**, v.369, p. 528, 1994.
- OWEN, R.E. Difficulties with the interpretation of patterns of genetic variation in the eusocial Hymenoptera. **Evolution**, v 39, p. 201–205, 1985.
- OWEN, R. E.; McCORQUODALE, D.B. Quantitative variation and heritability of postdiapause development time and body size in the alfalfa leafcutting bee (Hymenoptera: Megachilidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.84, p. 922–927, 1994.
- OWEN, R.E.; Packer, L. Estimation of the proportion of diploid males in populations of Hymenoptera. **Heredity**, v.72, p. 219–227, 1994.
- PAI, A.; YAN, G. Polyandry produces sexy sons at the cost of daughters in red flour beetles. **Proceedings of Biological Sciences**, v.269, p. 361–368, 2002.
- PALMER, J.D. et al. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.97, p. 6960–6966, 2000.
- PAMILO, P.; CROZIER, R.H.. Genetic variation in male haploids under deterministic selection. **Genetics**, v.98, p. 199–214, 1981.
- PAMILO, P.; VARVIO-AHO, S.L.; PEKKARINEN, A. Low enzyme gene variability in Hymenoptera as a consequence of haplodiploidy. **Hereditas**, v.88, p. 93–99, 1978.
- PARKER, G.A. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. **Biological Reviews**, v.45, p. 525–567, 1970.

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**. New York: New York Academic Press, 1984. p. 1–60.

PARKER, F.D.; FROHLICH, D.R.. Studies on management of the sunflower leaf-cutter bee. **Journal of Apicultural Research**, v.24, p. 125–131, 1985.

PARKER, L.; OWEN, R.E. Allozyme variation, linkage disequilibrium and diploid male production in a primitively social bee *Augoclorella striata* (Hymenoptera: Halictidae). **Heredity**, v.65, p. 241–248, 1990.

PARKER, L.; PLATEAUX-QUÉNU, C.; OWEN, R.E. Electrophoretic evidence that *Lasioglossum (Evyllaesus) mediterraneum* (Blüthgen) is a species distinct from *L. (E.) lacipes* (Schenck) (Hymenoptera, Halictidae), with notes on its phylogenetic position. **Canadian Entomology**, v.124, p. 371–380, 1992.

PARKER, P. et al. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, p. 361–382, 1998.

PEREIRA, S. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p. 745–752, 2000.

PERUQUETTI, R.C. **Aspectos da Biologia, Estrutura Populacional e Parentesco Intranidal em Vespas do Gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Sphecidae)**. 2003. 59 p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

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, 2003a.

PERUQUETTI, R.C.; DEL LAMA, M.A. Notas sobre a socialidade e a biologia de nidificação de *Trypoxylon (Trypoxylon) asuncicola* Strand, 1910 (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.47, p. 297–301, 2003b.

POTTS, S.G.; WILLMER, P. Abiotic and biotic factors influencing nest-side selection by *Halictus rubicundus*, a ground nest halictine bee. **Ecological Entomology**, v.22, p. 319–328, 1997.

QUELLER, D.C.; GOODNIGHT, K.F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v.43, p. 258–275, 1989.

RAFFIUDIN, R.; CROZIER, R.H.. Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.43, p. 543–552, 2007.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact test and ecumenism. **Journal of Heredity**, v.86, p. 248–249, 1995.

- RICHARDS, O.W. The American species of the genus *Trypoxylon*. **Transactions of the Royal Entomological Society of London**, v 82, p. 173–362, 1934.
- RODERICK, G.K. Geographic structure of insect populations: Gene Flow, Phylogeography, and Their Uses. **Annual Review of Entomology**, v.41, p. 325-352, 1996.
- RONQUIST, F. et al. Phylogeny of the Hymenoptera: A cladistic reanalysis of Rasnitsyn's (1988) data. **Zoologica Scripta**, v.28, p. 13-50, 1999.
- ROSENHEIM J.A.; NONACS, P., MANGEL, M.. Sex ratios and multifaceted parental investment. **American Naturalist**, v.148, p. 501–535, 1996.
- ROSENMEIR, L.; PACKER, L. A comparison of genetic variation in two sibling species pairs of haplodiploid insects. **Biochemical Genetics**, v.31. p. 185–200, 1993.
- ROSENZWEIG, M.L. A theory of habitat selection. **Ecology**, v.62, p. 327–335, 1981.
- ROTT, A.S.; GODFRAY, H.C.J. The structure of a leafminer–parasitoid community. **Journal of Animal Ecology**, v.69, p. 274–289, 2000.
- ROUBIK, D.W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 514 p.
- ROUBIK, D.W., WEIGT, L.A; BONILLA, M.A. Populations genetics, diploid males and limits to social evolution of Euglossine bees. **Evolution**, v.50, p. 931–935, 1996.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2<sup>nd</sup>ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 275p.
- SANTONI, M. M. **Biologia e estrutura genética intranidal de *Trypoxylon aurifrons* (Hymenoptera)**. Trabalho de Conclusão de Bacharelado em Ciências Biológicas, 2005. 79 p. Trabalho de Conclusão de Curso.
- SANTONI, M.M.; DEL LAMA, M.A. Biologia e Estrutura Genética Intranidal de *Trypoxylon aurifrons* (Hymenoptera). In: JORNADA CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 6, 2005, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2005. p. 40.
- 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.
- SBISÁ, E. et al. Mammalian mitochondrial D-Loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. **Gene**, v.205, p. 125–140, 1997.
- SCHWARZ, M.P. Local resource enhancement and sex ratios in a primitively social bee. **Nature**, v.331, p. 346–348, 1988.
- SEGER, J. Partial bivoltinism may cause alternating sex-ratio biases that favour eusociality. **Nature**, v 301, p. 59–62, 1983.

SHEPPARD, W.S.; McPHERON, B.A. Ribosomal DNA Diversity in Apidae. In: SMITH, D.R. (Ed.). **Diversity of the genus *Apis***. Westview: Bolder, C.O, 1991. p. 89–102.

SHOEMAKER, D.D., COSTA, J.T.; ROSS, K.G. Estimates of heterozygosity in two social insects using a large number of electrophoretic markers. **Heredity**, v.69, p. 573–582, 1992.

SILVESTRE, D. **Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2002. 119 p. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2002.

SIMMONS, L.W. **Sperm Competition and its Evolutionary Consequences in the Insects**. Princeton, Princeton University Press, 2001. 456 p.

SIMMONS, L.W. The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection, and offspring viability. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.36, p. 125–146, 2005.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v.87, p. 651–701, 1994.

SMITHIES, O. On electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, v.61, p. 620–641, 1955.

STARK, R.E. Sex ratio and maternal investment in the multivoltine large carpenter bee *Xylocopa sulcatipes* (Apoidea: Anthophoridae). **Ecological Entomology**, v.17, p. 160–166, 1992.

STORCH D.; FRYNTA, D. Evolution of habitat selection: stochastic acquisition of cognitive clues? **Evolutionary Ecology**, v.13, p. 591–600, 2000.

STROHM, E.; LECHNER, K. Male size does not affect territorial behaviour and life history traits in a sphecid wasp. **Animal Behaviour**, v.59, p. 183–191, 2000.

STROHM, E.; LINSÉNMAIR, K.E. Low resource availability causes extremely male based investment ratios in the European beewolf, *Philanthus triangulum* F. (Hymenoptera: Sphecidae). **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.264, p. 423–429, 1997.

STROHM, E.; LINSÉNMAIR, K.E.. Allocation of parental investment among individual offspring in the European beewolf *Philanthus triangulum* F. (Hymenoptera: Sphecidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.69, p. 173– 92, 2000.

STUBBLEFIELD, J. W.; SEGER, J. Sexual dimorphism in the Hymenoptera. In: SHORT, R.V.; BALABAN, E. (Eds.). **The differences between the sexes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p. 71–103.

SUGG, D.W. et al. Population genetics meets behaviour ecology. **Trends in Ecology e Evolution**, v.11. p. 338–342, 1996.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology e**

**Evolution**, v.15, p. 199–203, 2000.

TAKAHASHI, N.C. A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). **Evolution**, v.55, p. 1897–1899, 2001.

TAYLOR, P.D. Intra-sex and inter-sex sibling interactions as sex-ratio determinants. **Nature**, v.291, p. 64–66, 1981.

TEPEDINO, V.J.; TORCHIO, P.F. Temporal variability in the sex ratio of a non-social bee, *Osmia lignaria propinqua* Cresson: extrinsic determination or the tracking of an optimum? **Oikos**, v.38, p. 177–182, 1982.

TEPEDINO, V.J.; THOMPSON, R.; TORCHIO, P.F. Heritability for size in the megachilid bee *Osmia lignaria propinqua* Cresson. **Apidologie**, v.15, p. 83–88, 1984.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p. 4673–4680, 1994.

TORCHIO, P.F.; TEPEDINO, V.J. Sex ratio, body size, and seasonality in a solitary bee, *Osmia lignaria propinqua* Cresson (Hymenoptera: Megachilidae). **Evolution**, v.34, p. 993–1003, 1980.

TRIVERS, R.L.; WILLARD, D.E. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. **Science**, v.179, p. 90–92.

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

TSCHARNTKE, T.; GATHMANN, A.; STEFFAN-DEWENTER, I. Bioindication using trap-nesting bees and wasps and their natural enemies: community structure and interactions. **Journal of Applied Ecology**, v.35, p. 708–719, 1998.

VAN VEEN, F.J.F.; VAN HOLLAND, P.D.; GODFRAY, H.C.J. Stable coexistence in experimental insect communities due to density-mediated and trait-mediated indirect effects. **Annual Review of Entomology** 51: 187–208, 2005.

VILA, B.L.; CASSINI, M.H.. Time allocation during the reproductive season in vicunas. **Ethology**, v.97, p. 226–235, 1994.

VISSCHER, P.K.; DANFORTH, B.N. Biology of *Calliopsis pugionis* (Hymenoptera, Andrenidae): nesting, foraging, and investment sex-ratio. **Annals of the Entomological Society of America**, v.86, p. 822–832, 1993.

WATSON, P.J. Multiple paternity as genetic bet-hedging in female sierra dome spiders, *Linyphia litigiosa* (Linyphiidae). **Animal Behaviour**, v.41, p. 343–360, 1991.

WERREN, J.H.; CHARNOV, E.L. Facultative sex ratios and population dynamics. **Nature**, v.272, p. 349–350, 1978.

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

WEST, S.A.; SHELDON, B.C. Constraints in the evolution of sex ratio adjustment. **Science**, v.295, p. 1685–1688, 2002.

WIERNASZ, D.C. et al. Male size, sperm transfer and colony fitness in the western harvest ant, *Pogonomyrmex occidentalis*. **Evolution**, v.55, p. 324–329, 2001.

WHITING, P.W. Sex determination and reproductive economy in *Habrobracon*. **Genetics**, v.24, p. 110–111, 1939.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. **International Review of Cytology**, v.141, p. 173–216, 1992.

YAMAMURA, N. An evolutionarily stable strategy (ESS) model of postcopulatory guarding in insects. **Theoretical Population Biology**, v.29, 438–455, 1986.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4<sup>th</sup>ed. Upper Saddle: Prentice Hall, 1999. 929 p.