

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

**“ESTRUTURA GENÉTICA E SOCIOGENÉTICA DAS POPULAÇÕES E NINHOS
DE EUGLOSSINI (HYMENOPTERA: APIDAE) DETERMINADAS POR MEIO DE
MICROSSATÉLITES”.**

ROGÉRIO OLIVEIRA SOUZA

**SÃO CARLOS - SP
2007**

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

**“ESTRUTURA GENÉTICA E SOCIOGENÉTICA DAS POPULAÇÕES E NINHOS
DE EUGLOSSINI (HYMENOPTERA: APIDAE) DETERMINADAS POR MEIO DE
MICROSSATÉLITES ”.**

ROGÉRIO OLIVEIRA SOUZA

**Tese 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 obtenção
do Título de Doutor em Ciências. Área de
concentração: Genética e Evolução
Orientador: Marco Antonio Del Lama**

**SÃO CARLOS - SP
2007**

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

S729eg

Souza, Rogério Oliveira.

Estrutura genética e sociogenética das populações e ninhos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) determinadas por meio de microssatélites / Rogério Oliveira Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

78 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Genética de populações. 2. Machos diplóides. 3. Análise de ninhos. 4. Ecologia populacional. I. Título.

CDD: 575.15 (20^a)

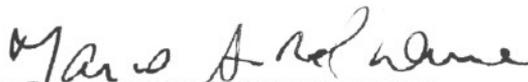
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

"ESTRUTURA GENÉTICA E SOCIOGENÉTICA DAS POPULAÇÕES E
NINHOS DE EUGLOSSINI (HYMENOPTERA: APIDAE)
DETERMINADAS POR MEIO DE MICROSSATÉLITES".

Tese de Doutorado de Rogério Oliveira Souza

Banca Examinadora

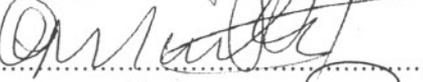
Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama



Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo



Prof. Dr. Celso Feitosa Martins



Profa. Dra. Maria José de Oliveira Campos



Profa. Dra. Isabel Alves dos Santos



SÃO CARLOS - SP

2007

**Onde estudar quero plantar árvores,
Em minha casa flores,
Na vida amores e amizades.**

**As sementes só mostrarão suas
reais qualidades quando forem
postas à prova.
É tempo de semear.**

**"Ní féidir capall rása a dhéanamh d'asal"
Todos têm seu tempo e seu ritmo.**

**“Porque, onde estiver o vosso tesouro,
ali estará também o vosso coração.”
Lucas 12, 34.**

**Aos meus Pais, Irmãos e
Amigos dedico.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas inúmeras bênçãos concedidas, ainda que o merecimento de quem as recebeu seja completamente questionável, mas que por ser infinitamente bom, Deus ainda as deu.

Aos meus muitíssimos amados pais Gilberto e Valmira, que repletos de amor e carinho têm lutado com todas as forças para que seus filhos se tornem pessoas corretas e tementes a Deus, respeitando e compreendendo as diferenças entre as pessoas e aprendendo a amá-las como são, assim como têm feito comigo.

Aos meus incríveis e muito amados irmãos Sergio, Luciana, Rosana, Gilberto Filho e Gustavo, cuja convivência é sempre uma dádiva e que, se em mim existem qualidades, se deve ao fato de neles serem de tamanha abundância, que sobraram até para mim.

Ao Professor Marco Antonio Del Lama, meu Amigo, Orientador, Exemplo Profissional que ama seus alunos e o seu trabalho e o faz com tanto respeito e dedicação. Um “Pai”, nos instruindo muito além da genética e biologia, mas nos dando exemplos de justiça evidenciando, que muito mais do que bons profissionais, o mundo carece de pessoas boas e verdadeiras. Peço a Deus que o senhor possa iluminar os caminhos de muitos mais, e saiba que seus alunos o amam.

To Prof. Robert J. Paxton for his friendship, receptivity and disposition in receive and treat me in an incredible way, giving me a remarkable experience of life, as well an opportunity of professional and personal growth.

Às minhas amigas de longa data do laboratório Isabel Cristina de Godoy, Kátia Maria Ferreira, Margarita Maria López-Uribe, Mariana Marchi Santoni e Thaís Collet, que tanto me ensinaram durante todo esse tempo de convivência muito prazerosa, e aos que chegaram mais recentemente, nessa escala quase que evolutiva de laboratório, Amanda P. Ucci, Camilla

OBRIGADO!!

Helena da Silva, Cíntia Akemi Oi, Érika Molina, Juliano Costa de Almeida, Keize Nagamati Jr., Luci Shibata, Natália Cerantola, Otávio Lino e Silva, Pricilla De Paula Loiola e Vanessa Domingues Ramalho.

À Professora Sílvia N. Del Lama por sua amizade, carinho e preocupação “quase que materna” durante todos esses anos, bem como meus amigos sobre sua tutela, Carolina I. Miño, Erika Ramos, Iara F. Lopes, Juliana Rossi, Luíza Helena S. Avelar, Mateus Henrique dos Santos e Rafael R. Canevarolo.

Aos amigos de São Carlos Elisângela S. O. Dantas, Liano e Silvana Centofante, Marcelo Ricardo Vicari, Patricke, Talita e Sumaia Gaspar, Raquel, Tatiana Rochel e Paula Coelho Xavier pela amizade durante todos esses anos.

Aos amigos de peladas Sadao, Luciano DW, Alexandre Broxa, Alê Jaca, Douglas, Zé Pedro, Fernando, Felipe, Felipe Plack, Cervini, Léo Souza, Thori, Fábio Hanashiro, Leandro Takao, Julianos, Alce e outros tantos, cujos anos na universidade têm propiciado aumento não na habilidade ou velocidade em jogar bola, mas aumento nos números dos uniformes.

To my friends Antonella Soro, David Kelly, Elaine O'Mahony, Emma Seale, Ian, Julia Klee, Lesya, Loise, Maria Hughes, Marion Zobel, Paulo Prodöhl, Sandra Mustafá, Stephen Walker, Stuart Bearhop, Tomás Murray and Ulrich Ernst and Queen's University of Belfast members, whose friendship made my time at QUB something special to really remember.

Aos professores da Pós-Graduação em Genética e Evolução da UFSCar, Norma Mortari, Gilberto Moraes, Flávio Henrique da Silva, Luciana Regitano, Maurício de Alencar, Orlando M. Filho, Luís A. C. Bertollo, Pedro Galetti e Reinaldo Brito por desempenharem e participarem de um momento de tamanha importância na minha formação.

Aos amigos do DGE e Federal Ive, Luís Inoue, Luciana, Timba, Araceli, Rodrigo, Andréa, César, Luís, Viviane, Regina, Fernanda, Samanta, Alessandra, Pedro, Ana Karina, Wellington, Iderval, Pedro, Fernanda, Andréa, Douglas e a todos dos laboratórios de

OBRIGADO!!

Imunogenética, Imunogenética/DNA, Bioquímica Adaptativa, Biologia Molecular, Citogenética, Genética de Populações e Evolução, Evolução Molecular, Genoma, Genética de Aves e Genética Evolutiva de Himenópteros.

Aos amigos e funcionários da Universidade Federal de São Carlos do DGE e PPGEV: Dona Rita, Luiz Henrique da Silva (Piau), Antonio D. A. da Silva (Toninho), Jorge I. da Silva (Jorjão), Cláudio A. F. Vargas, Tatiane R. Landgraf, Rodrigo Henrique Cabrera, Greissi G. Oliveira, Rosemeire A. T. Curilla (Rose), Regiane Ribeiro e Tatiane T. Calligari, que tanto me auxiliaram neste trabalho.

À Daniele, Mirele, Graciele, Alexandre, Célio e Noely Boraschi e parentes, pelo amor, amizade, força, carinho, compreensão, compartilhando de uma forma muito especial suas vidas comigo e todos os amigos que fiz em Americana.

À Maria Carolina, João Paulo, Zenilda e Romoaldo Donatoni e parentes, pelo amor e amizade recebendo-me de maneira muito especial em suas vidas.

À Camilla Helena da Silva que veio participar da minha vida de uma forma muito tranqüila, refletindo sua personalidade calma, por vezes “introspectiva”, de riso fácil e um tanto sonoro. Sua felicidade e paz têm preenchido meus dias e me feito sorrir mais, se é que isto é possível.

Aos incríveis amigos da comunidade Irlando-Brasileira José Areias, Shila, Neuza, Edineide, Antônio e Antônia; Suzel Reily, Toninho e Samira; Marina; Marcos Luciano Bruschi, Michelli e Gabriel; Hugo Leonardo Ribeiro, Agatha e Pedro; Fernando Colantuono e Camila El Dashe; Greg e Cléa; Márcio e família; João Paulo de Holanda Neto, Javier Perez De La Cruz, Rosivaldo de Sousa e Massimo Piantá.

À família Ua Bruadair, pais do Diarmaid e Cormack; de modo muito especial à família Ua Bruadair de Sousa, Diarmaid, Alvina, Lára Emília e Alana (as três princesinhas do Diarmaid) por terem me “adotado”, fazendo com que a saudade de casa fosse só um pequeno

OBRIGADO!!

detalhe, constituindo as pessoas das quais me orgulho de ter conhecido e que estão associadas às minhas melhores lembranças da Irlanda.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o estágio na Irlanda, em especial aos técnicos Marta Elias Ribeiro de Oliveira e Marcos Antônio Borges Trajano pelo acompanhamento seguro no decorrer do trabalho e ao CNPq pelo apoio financeiro durante três anos.

Ao IBAMA, pela concessão da licença de coleta e transporte do material, e em especial à técnica responsável Dra. Helena K. Boscolo.

À EMBRAPA Pecuária Sudeste e aos Funcionários do Canil Municipal de São Carlos, por permitirem a coleta de material em suas áreas.

Ao Parque Ecológico de São Carlos, pela concessão de coleta de material em sua área.

OBRIGADO!!

RESUMO

As abelhas Euglossini são polinizadores importantes de várias espécies Neotropicais e, particularmente, para as orquídeas, onde a relação espécie-específica abelha-flor pode ser decisiva no sucesso reprodutivo destas plantas. Os machos são os polinizadores efetivos das orquídeas, cujos compostos atrativos produzidos por estas foram isolados e têm sido utilizados em diversos estudos envolvendo os machos de Euglossini. Os marcadores alozímicos, mais comumente utilizados nos estudos do grupo, apresentam em geral, um baixo polimorfismo, o que limita de certa forma as análises populacionais. Visando analisar de uma maneira mais acurada a genética das populações e de ninhos destas espécies de abelhas foram desenhados primers flanqueando locos de microssatélites em *Eulaema nigrita* e *Euglossa cordata* (13 locos cada). O emprego destes marcadores em 483 machos de 23 espécies de Euglossini dos gêneros *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema* e *Exaerete* provenientes de diversas regiões do Brasil revelou a presença somente de dois machos diplóides, um em *Euglossa annectans* e outro em *Euglossa mandibularis*. Estes achados reforçam a proposição de que os machos diplóides (geralmente inviáveis ou estéreis) não são freqüentes em populações destas abelhas do Brasil, corroborando dados prévios obtidos por meio de análise alozímica. O emprego dessa metodologia na avaliação da estrutura nidal revelou ainda que em *Eulaema nigrita* (oito ninhos) ocorre o compartilhamento do ninho entre fêmeas não aparentadas. Para as espécies *Euglossa cordata* e *Euglossa townsendi* (11 e sete ninhos, respectivamente) os ninhos, via de regra, são formados por uma fêmea acasalada com um único macho, embora para *E. townsendi* também tenha sido observado o compartilhamento de ninho por fêmeas não aparentadas. Os dados aqui apresentados lançam um novo olhar sobre a genética das populações e a estrutura sociogenética nidal de Euglossini, sendo, certamente, uma

contribuição importante para o avanço do conhecimento a respeito da biologia e genética deste grupo de abelhas.

PALAVRAS-CHAVE: Abelhas Euglossine, machos diplóides, estrutura nidal, locos microssatélite.

ABSTRACT

Euglossine bees are important pollinators of many Neotropical plant species, particularly orchids which could present a species-specific bee-flower relationship, essential to the reproductive success of these plants. Orchids produce chemical compounds to attract males of Euglossine bees (the effective pollinators of the orchids), and these compounds were isolated and are being used to study the biology of the euglossine males. Allozymes markers, although their low polymorphism content, were widely applied in population analyses. In order to provide a powerful tool to be applied to nest and population genetics research, primers flanking microsatellite loci were developed for *Eulaema nigrita* and *Euglossa cordata* (13 loci each). The use of these markers in 483 euglossine males of *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema* and *Exaerete* species, sampled in several Brazilian biomes and areas, evidenced the presence of only two diploid males, one in *Euglossa annectans* and other in *Euglossa mandibularis*. These findings support the hypothesis that diploid males (usually unviable or sterile individuals) occur in low frequencies in Brazilian Euglossine bee populations, a fact that is according to previous studies using allozymes. The application of these markers to nest structure analyses revealed nest sharing among unrelated females of *Eulaema nigrita* (eight nests). For *Euglossa cordata* and *Euglossa townsendi* nests (11 and seven nests, respectively), analysis demonstrated that monogamy (one female mated with a single male) is the rule, although nest sharing among unrelated females could also occur in *E. townsendi*. These results give a new focus on the research about population genetics and nest sociogenetic structure of Euglossine bees, opening new insights on the Euglossini biology and genetics.

KEYWORDS: Euglossine bees, diploid males, nest structure, microsatellite loci.

Lista de Figuras	Pg
Figura 1. Fêmea adulta do gênero <i>Pepsis</i> (Pompilidae).....	01
Figura 2. Macho de <i>Aglae caerulea</i>	03
Figura 3. Macho de <i>Eufriesea violacea</i>	03
Figura 4. À esquerda, <i>Euglossa mandibularis</i> (macho), e à direita <i>Euglossa cordata</i> (fêmea).....	04
Figura 5. À esquerda, <i>Eulaema nigrita</i> e à direita <i>Eulaema meriana</i> (machos).....	04
Figura 6. Machos de <i>Exaerete smaragdina</i> (a) e <i>Exaerete frontalis</i> (b).....	05
Figura 7. Machos de <i>Euglossa truncata</i> (a), sua tíbia posterior com destaque para a área da franja (b) e de <i>Eulaema mocsaryi</i> (c). Polinários de orquídeas aderidos ao dorso de machos (a) e (c).....	06
Figura 8. Esquema representando os conjuntos cromossômicos do sistema genético da haplodiploidia arrenótoca.....	08
Figura 9. Esquema representando as possíveis rotas evolutivas para a eussocialidade nos himenópteros.....	09
Figura 10. Ninho de <i>Eulaema nigrita</i> retirado do interior de um bloco de construção. As células foram construídas utilizando barro, excremento e resina.....	10
Figura 11. Ninho ocupado por várias fêmeas de <i>Euglossa townsendi</i> construído com utilização de resinas em uma secção de bambu, onde foi observada reutilização das células. Destaque para arquitetura das células (direita).....	11

	Pg
Figura 12. Corbícula de <i>Euglossa cordata</i> (a) e segmento modificado em <i>Exaerete smaragdina</i> , uma espécie cleptoparasita (b).....	12
Figura 13. Padrões filogenéticos entre os grupos de abelhas corbiculadas. Árvore filogenética obtida pela análise de caracteres morfológicos (a). Filogenia obtida pela análise de seqüências de DNA para múltiplos genes (b). [Retirado de Cameron 2004].....	13
Figura 14. Hipóteses das relações filogenéticas entre os gêneros de Euglossini. Relações traçadas com uso de morfologia (a, b, c); relações traçadas utilizando morfologia e dados fósseis (d); filogenia proposta com base em seqüências de quatro genes e morfologia (e). [Retirado de Cameron 2004].....	14
Figura 15. Esquema representando os conjuntos cromossômicos do sistema genético da haplodiploidia arrenótoca, com destaque para homozigose no loco sexual levando à formação dos machos diplóides.....	16
Figura 1. Ninho de <i>Eulaema nigrita</i> observado no interior de um bloco de construção. As células foram feitas com a utilização de barro, excremento e resina...	69
Figura 2. Ninho de <i>Euglossa cordata</i> construído em secção de bambu. As células, feitas com resina, apresentam coloração bastante variável.....	69
Figura 3. Entrada de um ninho de <i>Euglossa cordata</i> construído em um toco de <i>Eucalyptus</i> sp. anteriormente ocupado por <i>Xylocopa</i> sp.....	69

Table 1. Details of the 20 microsatellite loci developed for <i>Eulaema nigrita</i> (Eln) and <i>Euglossa cordata</i> (Egc) from Brazil (one population of each species), with 23 <i>E. nigrita</i> females (diploid) and 134 <i>E. cordata</i> individuals (67 haploid males and 67 diploid females) analyzed.....	30
Table 2. Results of cross-species amplification using microsatellite primers designed for <i>Euglossa cordata</i> (9 loci, Egc) and <i>Eulaema nigrita</i> (11 loci, Eln) in 23 species of euglossine bees.....	32
Table 1. Microsatellite loci developed for <i>Euglossa cordata</i> and <i>Eulaema nigrita</i> (Souza <i>et al.</i> 2007) used to analyse euglossine bee species and marker variability (expected intralocus heterozygosity).....	51
Table 2. Species name, collection sites, number of males sampled (n), range of expected intralocus heterozygosity (H_i), expected mean heterozygosity (H_{exp}), probability of detecting a heterozygous male if diploid ($Phet$), observed number of 2N males and expected maximum frequency of 2N males (for $n \geq 19$) in samples of euglossine bees.....	53
Tabela 1. Razão sexual e taxa de emergência para oito ninhos de <i>Eulaema nigrita</i> coletados no interior de blocos de construção no Campus da UFSCar em São Carlos (SP).....	67
Tabela 2. Razão sexual e taxa de emergência para onze ninhos de <i>Eg. cordata</i> e sete ninhos de <i>Eg. townsendi</i> coletados em ninhos armadilhas e em ramo de <i>Bougainville</i> sp. nas cidades de Araras, Rifaina e São Carlos (SP).....	68

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	01
<i>HYMENOPTERA.....</i>	01
<i>EUGLOSSINI – Aspectos gerais.....</i>	02
Euglossíneos e as Orquídeas.....	05
Partenogênese e Haplodiploidia.....	07
Comportamento Social.....	08
Filogenia.....	12
Estudos Genéticos Realizados.....	15
2. PROPOSIÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
4. DELINEAMENTO E APRESENTAÇÃO.....	20

5. Capítulo I – “Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae)”	22
6. Capítulo II – “Microsatellite analysis demonstrates that diploid males are uncommon in euglossine bee populations from Brazil”	35
Abstract	36
Introduction	37
Materials and Methods	39
Results	40
Discussion	42
References	48
7. Capítulo III – “Determinação da estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini com o uso de DNA microssatélite.”	54
Resumo	55
Introdução	56
Material e Métodos	57
Resultados	58
Discussão	62
Conclusões	64
Referências	65
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	70
9. REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

HYMENOPTERA

A Ordem Hymenoptera é a terceira maior ordem de insetos vivos. Usualmente associada apenas às abelhas, vespas e formigas, esta Ordem engloba também grupos mais primitivos, como Symphyta e Parasitica. Somente para as abelhas foram descritos 425 gêneros, que agrupam mais de 16.300 espécies do mundo todo (MICHENER, 2000). Apresentando tamanho bastante variável, seus representantes podem ter desde frações de milímetros até cerca de 7 cm, como em alguns Pompilidae pertencentes ao gênero *Pepsis* (Figura 1).



Figura 1. Fêmea adulta do gênero *Pepsis* (Pompilidae).

Os Himenópteros, especialmente as abelhas, são muito importantes na polinização de diversas espécies de plantas e, em muitos casos, são os polinizadores exclusivos de algumas espécies, desempenhando, portanto, um papel fundamental na manutenção da biodiversidade da flora, além do benefício econômico gerado pela polinização dos cultivares (NEFF & SIMPSON, 1993). Algumas espécies podem ser nocivas ao homem, como as saúvas, que são uma das principais pragas agrícolas do Brasil (GALLO *et al.*, 2002).

Há indícios que o surgimento dos insetos polinizadores, particularmente as abelhas, tenha se iniciado pouco depois do aparecimento das fanerógamas no início do Cretáceo cerca

de 140 a 135 milhões de anos (CRANE *et al.*, 1995), pois a abelha fóssil mais antiga (*Melittosphex burmensis*) data do início do Cretáceo (POINAR & DANFORTH, 2006). Provavelmente, como diversos outros grupos, as abelhas devem ter tido seu ápice de radiação no médio Cretáceo, quando ocorreu também a explosão diversificadora das angiospermas (ENGEL, 2000). Segundo DIETZ (1982), o crescimento da oferta de néctar e pólen foi o fator mais provável para a mudança de um hábito predatório, presente nos ancestrais e ainda hoje nas vespas, para o de coleta de pólen.

EUGLOSSINI - Aspectos gerais

As abelhas da tribo Euglossini (eu = verdadeiro, glossa = língua) têm como característica principal a presença de uma glossa bastante longa, e muitos de seus representantes possuem um tegumento metálico (KIMSEY, 1980). A subfamília Apinae, em especial o grupo dos corbiculados, é composta pelas tribos Apini, Bombini, Euglossini, Meliponini, Electrapini, Electrobombini e Melikertini, sendo que as três últimas são fósseis (ENGEL, 2005).

A distribuição das abelhas Euglossini é restrita à região Neotropical, ocorrendo entre os paralelos 29° Norte e 32° Sul (BÚRQUEZ, 1997).

A tribo está constituída de cinco gêneros - *Aglae*, *Eufriesea*, *Euglossa*, *Eulaema* e *Exaerete* (DODSON *et al.*, 1969), e mais de 200 espécies, conforme descrito em RAMÍREZ *et al.* (2002).

Aglae caeruleae (Lepelletier & Serville, 1825) é a única representante do gênero (Figura 2), com distribuição considerada restrita à Bacia Amazônica. Recentemente, espécimes foram coletados na Chapada dos Guimarães, próximo a Cuiabá no estado do Mato Grosso (DOS ANJOS-SILVA *et al.*, 2006). *A. caeruleae* é uma espécie cleptoparasita de *Eulaema*.

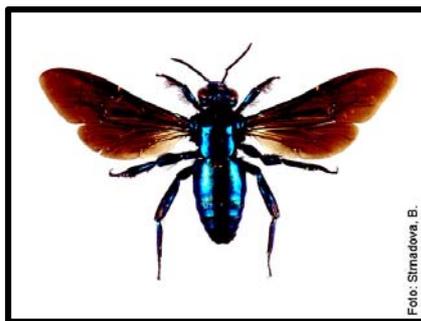


Figura 2. Macho de *Aglae caerulea*.

O gênero *Eufriesea* (Cockerell, 1909) é constituído de 60 espécies (RAMÍREZ *et al.*, 2002), em sua maioria sazonal (Figura 3). Os adultos aparecem durante dois ou três meses (nas estações chuvosas) e possuem coloração vistosa.



Figura 3. Macho de *Eufriesea violacea*.

As abelhas do gênero *Euglossa* (Latreille, 1802), por apresentarem poucos pelos, expõem seu tegumento metálico-brilhante; sua coloração pode ser verde, azul, bronze e, por vezes, marrom (Figura 4). Este gênero agrupa o maior número de espécies (103 sp. - RAMÍREZ *et al.*, 2002).



Figura 4. À esquerda, *Euglossa mandibularis* (macho), e à direita *Euglossa cordata* (fêmea).

Eulaema (Lepeletier, 1841) exibe ampla distribuição, sendo observado em todos os locais de ocorrência da tribo (KIMSEY & DRESSLER, 1986). Segundo RAMÍREZ *et al.* (2002) o gênero é constituído de 15 espécies (Figura 5).



Figura 5. À esquerda, *Eulaema nigrita* e à direita *Eulaema meriana* (machos).

Nas Figuras 6a e 6b temos dois representantes de *Exaerete* (Hoffmannsegg, 1817), gênero que agrupa 7 espécies cleptoparasitas de *Eufriesea* e *Eulaema* (DOS ANJOS-SILVA & ENGEL, no prelo). Chaves de identificação para este grupo foram propostas por MOURE (1964) e DOS ANJOS-SILVA & ENGEL, no prelo).

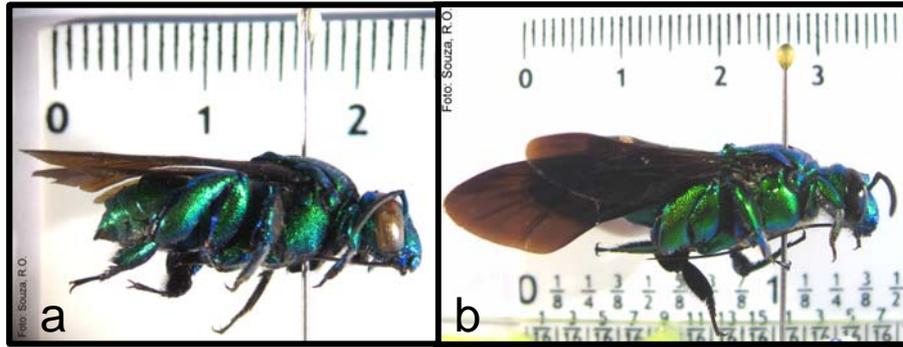


Figura 6. Machos de *Exaerete smaragdina* (a) e *Exaerete frontalis* (b).

Euglossíneos e as Orquídeas

Os Euglossíneos são conhecidos também pelo nome de abelhas das orquídeas (Figura 7a,c), principalmente pela relação que os machos dessas abelhas têm com orquídeas Catasetinae (*Catasetum*, *Cycnoches* e *Mormodes*) e Stanhopeinae (*Acineta*, *Coeliopsis*, *Coryanthes*, *Gongora* e *Stanhopea*, entre outros gêneros desta subfamília). Atualmente, são conhecidas cerca de 650 espécies de orquídeas polinizadas exclusivamente por machos de Euglossini (ACKERMAN, 1983; DRESSLER, 1968). Dentre as fanerógamas, as orquídeas representam cerca de 10% das espécies (revisão em CAMERON, 2004).

A polinização cruzada promovida por esses machos parece ter sido um fator evolutivo crucial no que se refere à especialização das orquídeas na oferta de fragrâncias aos machos. Este estreito relacionamento (machos-orquídeas) tem sido atualmente descrito como síndrome dos polinizadores, sendo relatadas para diversas espécies características da coevolução entre elas. Nestas flores (e em outras fontes), os machos coletam substâncias aromáticas que são armazenadas no órgão tibial (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1965), cavidade presente no terceiro par de pernas desses machos (Figura 7b).

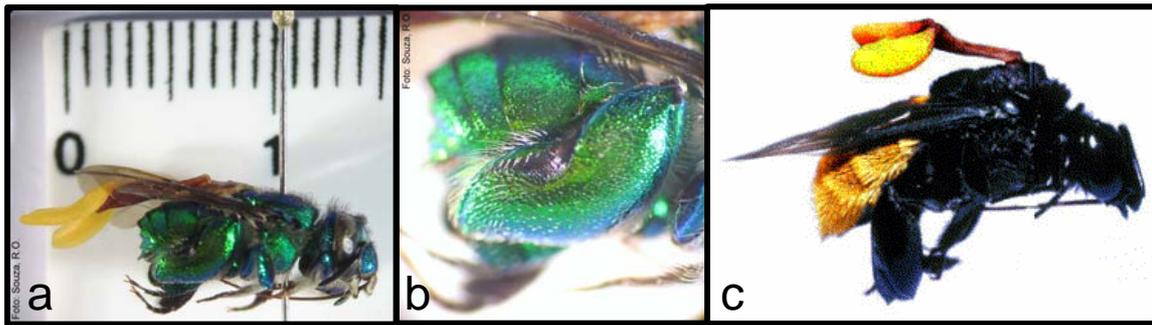


Figura 7. Machos de *Euglossa truncata* (a), sua tibia posterior com destaque para a área da franja (b) e de *Eulaema mocsaryi* (c). Polinários de orquídeas aderidos ao dorso de machos (a) e (c).

Este hábito de coleta de fragrâncias, a identificação dos compostos atrativos aos machos (isolamento e síntese) e posterior uso destes compostos como iscas, foram fatores importantes na descrição de muitas espécies (DODSON *et al.*, 1969), fato que contou com a enorme colaboração dos orquidologistas.

Estudos de habitats com diferentes níveis de impactação antrópica (OTERO & SANDINO, 2003); estimativa de ocorrência de espécies em áreas de Mata Atlântica (NEMÉSIO & SILVEIRA, 2004), ou cerrado (DOS ANJOS-SILVA, 2006; NEMÉSIO & FARIA JR, 2004), distância de incursão em monoculturas para coleta de fragrâncias (MILET-PINHEIRO & SCHLINDWEIN, 2005), e estimativa de machos diplóides em populações de Euglossini (ROUBIK *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2001) estão entre algumas das perguntas em que a técnica de amostragem empregada foi a utilização desses compostos atrativos.

Hipóteses têm relacionado o aumento da complexidade dos compostos armazenados nas tíbias dos machos e seu fitness. A manipulação dessas fragrâncias, algumas das quais são tóxicas, poderia sinalizar para as fêmeas uma maior robustez e sobrevivência dos possíveis parceiros de acasalamento. Um exemplo extremo foi observado em *Eufriesea pupurata*, onde

os machos coletavam DDT e estocavam em suas tíbias, sem aparentar qualquer efeito negativo da manipulação dessa substância tóxica (ROBERTS *et al.*, 1982).

Estudos mais recentes com eletroantogramas têm demonstrado os efeitos de diferentes compostos nos sistemas sensoriais de várias espécies (ELTZ *et al.*, 2006; ELTZ & LUNAU, 2005), reforçando a idéia de que tais compostos seriam armazenados na tíbia posterior, metabolizados e exalados de forma a atrair as fêmeas para cópula. (ELTZ *et al.*, 2006) observaram ainda respostas espécie-específicas para uma série desses substratos voláteis.

A maior parte dos trabalhos já realizados em Euglossini fez uso da amostragem por meio de iscas odores devido à facilidade de captura dos machos quando comparada às buscas ativas com redes entomológicas ou similares.

Partenogênese e Haplodiploidia

Partenogênese é o processo pelo qual indivíduos adultos se desenvolvem a partir de ovos não fecundados. Nos himenópteros são observados três tipos de partenogênese:

- 1 arrenótoca: ovos fecundados dão origem a fêmeas e ovos não-fecundados originam machos (grande maioria das espécies);
- 2 deuterótoca: ovos não-fecundados podem originar machos ou fêmeas, dependendo de fatores ambientais (os mecanismos responsáveis por esse evento ainda não são muito claros);
- 3 telítoca: fêmeas diplóides originam outras fêmeas por meio de processos assexuados.

Somente algumas espécies são conhecidas como pertencentes a essas duas últimas categorias, valendo frisar que a deuterotoquia não é bem entendida, uma vez que casos de

telitoquia podem ser considerados, sob determinadas circunstâncias, deuterotoquia (ESKAFI & LEGNER, 1974; WHITE, 1973).

Estima-se que a haplodiploidia arrenótoca (Figura 8) ocorra em aproximadamente 20% das espécies do reino animal (COWAN & STAHLHUT, 2004).

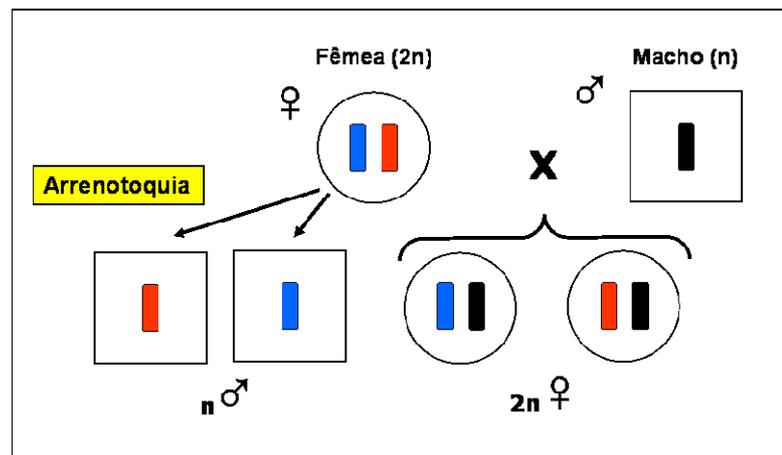


Figura 8. Esquema representando os conjuntos cromossômicos do sistema genético da haplodiploidia arrenótoca.

Comportamento Social

Com relação ao comportamento social, podemos encontrar em Euglossini (Figura 9), de acordo com a classificação tradicional (MICHENER, 1974; WILSON, 1971), espécies: (1) solitárias (fêmeas nidificam sozinhas, provisionando de forma massal seus ninhos e não interagem com sua prole); (2) comunais (fêmeas de mesma idade nidificam em local comum, porém cada uma constrói suas células para oviposição); (3) quasissociais (fêmeas de mesma idade nidificam em local comum, todas elas cooperam na construção e provisionamento das células de cria e todas as fêmeas ovipositam); (4) semi-sociais (fêmeas de mesma idade nidificam em local comum, porém uma ou poucas monopolizam o trabalho reprodutivo, enquanto que outras cuidam da manutenção do ninho). A categoria chamada de parassocial tem como característica a interação de fêmeas de uma mesma geração dentro do ninho. Esta

engloba, portanto, os comunais, quasissociais e semissociais.

A rota conhecida como subsocial seria caracterizada pela presença de uma única fêmea construindo seu ninho e permanecendo dentro ou próximo a ele para cuidar da prole. Num estágio posterior, a fêmea viveria o bastante para interagir com a prole adulta, que auxiliaria na criação das futuras gerações.

Embora estejam presentes representantes para esse amplo espectro comportamental, a maioria das espécies de Euglossini apresenta baixa sociabilidade. Ainda assim, a diversidade de sistemas sociais observados no grupo tem despertado grande interesse, pois tamanha variedade pode fornecer bons indícios sobre possíveis mecanismos envolvidos no estabelecimento do comportamento social. A análise conjunta da filogenia e da organização dos sistemas sociais pode ser ferramenta valiosa no esclarecimento dos mecanismos facilitadores de sistemas sociais.

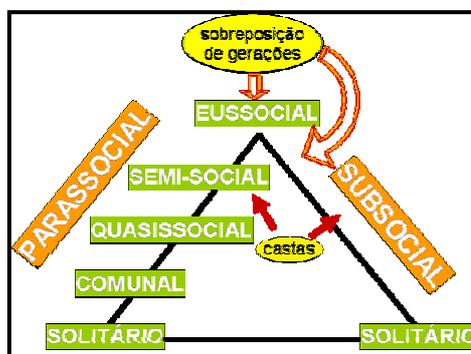


Figura 9. Esquema representando as possíveis rotas evolutivas para a eussocialidade nos himenópteros.

Um exemplo de sistema social bem definido foi descrito em *Eulaema nigrata* (PEREIRA-MARTINS, 1991; PEREIRA-MARTINS & KERR, 1991; SANTOS & GARÓFALO, 1994; ZUCCHI *et al.*, 1969). Os padrões de comportamento observados nesta espécie foram do tipo comunal (compreendido pela rota parassocial), sendo observado desta forma, várias fêmeas vivendo juntas e cuidando de suas células de modo independente,

um comportamento mais avançado com a construção de células em um mesmo favo e utilização comum do material de construção e defesa dos ninhos contra inimigos comuns, utilizando materiais que não despertavam a atenção de possíveis predadores.



Figura 10. Ninho de *Eulaema nigrita* retirado do interior de um bloco de construção. As células foram construídas utilizando barro, excremento e resina.

Colônias comunais foram descritas em *Euglossa imperialis*, uma grande e bela abelha esverdeada, em que o número de células construídas e aprovisionadas era, por vezes, menor que o de fêmeas forrageadoras. Esta observação sugere indícios de atividade cooperativa, pois todas as fêmeas apresentavam seus ovariolos dilatados (ROBERTS & DODSON, 1967).

GARÓFALO (1992) observou em *Euglossa cordata* que somente uma fêmea era a responsável pela postura e aprovisionamento de cada ninho, e que as fêmeas permaneciam no ninho até o momento da emergência da prole. Para os treze ninhos amostrados, foram observados 24 machos e 28 fêmeas (total), variando de seis à 10 indivíduos por ninho, considerando os ninhos que apresentaram condições de desenvolvimento completo.

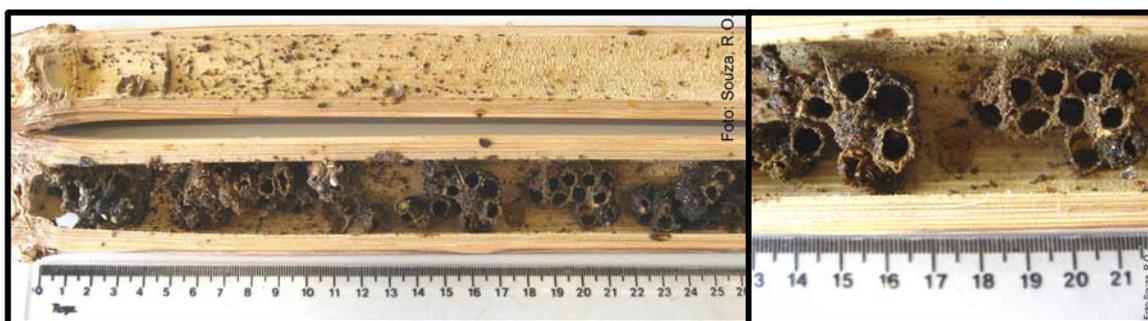


Figura 11. Ninho ocupado por várias fêmeas de *Euglossa townsendi* construído com utilização de resinas em uma secção de bambu, onde foi observada reutilização das células. Destaque para arquitetura das células (direita).

AUGUSTO & GARÓFALO (1998) observaram em *Euglossa fimbriata* a utilização de uma caixa usada para atrair Meliponini. Estes autores observaram que as fêmeas ali nidificantes estavam divididas em forrageadoras e poedeiras, e somente poedeiras. Essa segunda classe realizava oofagia, sendo, portanto, as responsáveis pela progênie da colônia

Um comportamento primitivamente social também foi observado em *Euglossa championi* e *Euglossa hyacinthina* por EBERHARD (1988), que constatou a atividade de fêmeas construindo, aprovisionando e ovipositando em células de um mesmo ninho.

Um ninho contendo mais de trezentas células foi reportado por BENNETT (1965) em *Eulaema terminata*, o qual, segundo o autor, tinha a manutenção/ construção das células mantida por pelo menos sete fêmeas, sendo uma delas capturada durante a remoção do ninho, enquanto que as demais escaparam. A presença de uma fêmea mais velha morta no ninho; captura de uma fêmea dias antes da remoção do ninho; presença de uma fêmea no interior do ninho e de outras nas proximidades no momento da remoção deste; detecção de, pelo menos, três células parcialmente aprovisionadas; diferença de tempo na emergência de adultos; progênie somente de machos, e ocorrência de células mais velhas vazias fornecem indícios muito fortes sobre a existência de um sistema social primitivo nesta espécie, segundo este

autor.

MYERS & LOVELESS (1976), estudando *Euplusia (Eufriesea) surinamensis* sugeriram que a vantagem de uma vida em agregados estaria na reutilização de ninhos velhos e na possibilidade de reutilizar ninhos parcialmente aprovisionados, após a morte ou desaparecimento dos antigos usuários. Os autores sugeriram ainda que a vida em agregados apresente uma menor pressão de predação e parasitismo, não sendo verificada, contudo, tal hipótese nesta espécie.

Filogenia

Os Euglossini estão inseridos no grupo das abelhas que apresentam corbícula, uma alteração no último par de pernas das fêmeas (Figura 12a). A tíbia desse par de pernas foi modificada de forma que uma depressão é utilizada para estocar o material coletado em campo, seja ele provisões (pólen ou açúcares) para as crias ou material para a construção do ninho (barro, excrementos, resinas). Contrastando com este fato, nos Euglossini onde o cleptoparasitismo é observado (*Aglae* e *Exaerete*), as fêmeas não apresentam corbícula (Figura 12b).

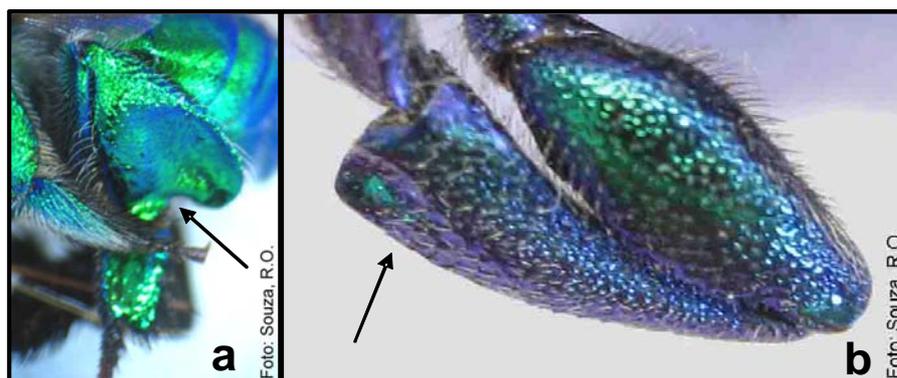


Figura 12. Corbícula de *Euglossa cordata* (a) e segmento modificado em *Exaerete smaragdina*, uma espécie cleptoparasita (b).

Embora seja um aspecto interessante do comportamento, a origem única ou múltipla do cleptoparasitismo nos Euglossini ainda é uma questão aberta (revisão de CAMERON, 2004).

O grupo dos corbiculados (representantes vivos) é composto ainda por Apini, Bombini e Meliponini (Figura 13a,b), e mesmo considerando a grande importância do grupo de abelhas corbiculadas, a filogenia do grupo ainda apresenta divergências considerando os caracteres utilizados (CAMERON, 2004).

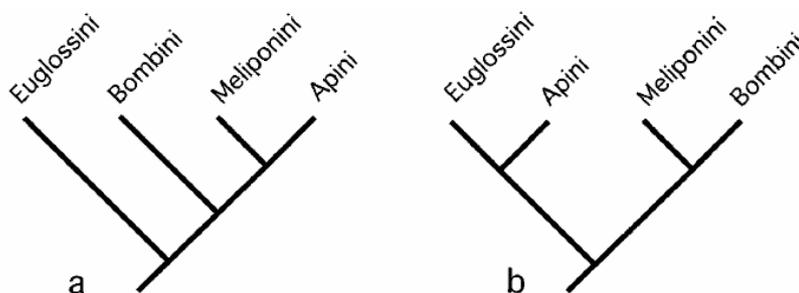


Figura 13. Padrões filogenéticos entre os grupos de abelhas corbiculadas. Árvore filogenética obtida pela análise de caracteres morfológicos (a). Filogenia obtida pela análise de seqüências de DNA para múltiplos genes (b). [Retirado de CAMERON, 2004].

De forma semelhante, a filogenia envolvendo os gêneros de Euglossini não está esclarecida. A análise topológica das árvores não se repete entre as várias hipóteses propostas, embora dicotomias antes existentes pareçam ter sido resolvidas (Figura 14).

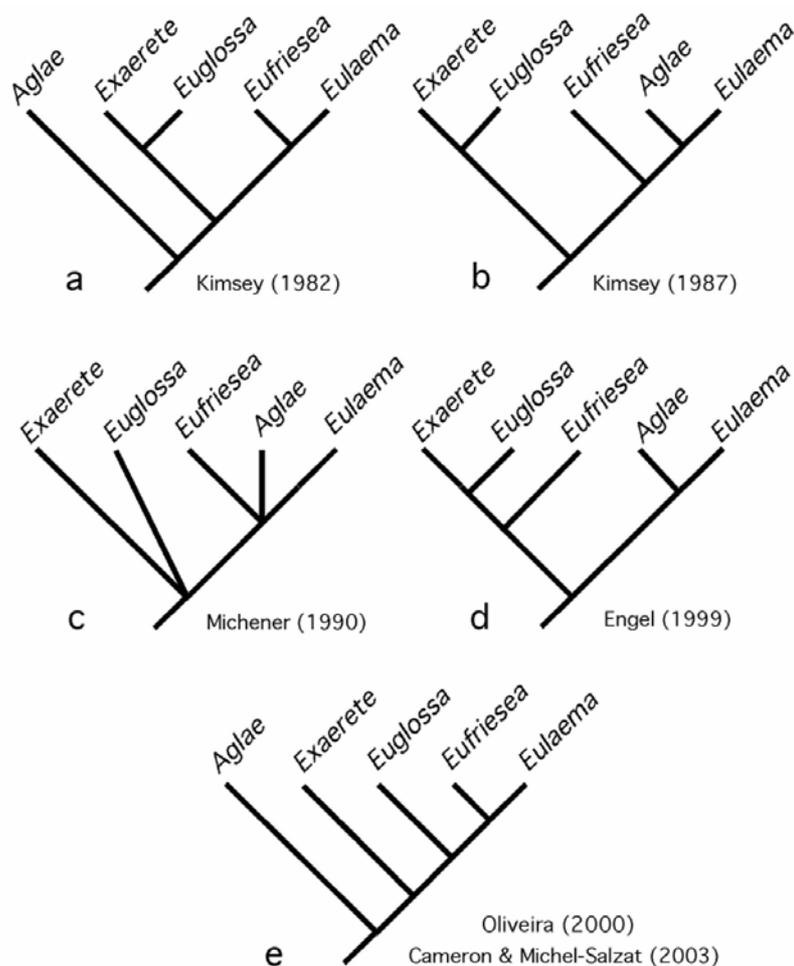


Figura 14. Hipóteses das relações filogenéticas entre os gêneros de Euglossini. Relações traçadas com uso de morfologia (a, b, c); relações traçadas utilizando morfologia e dados fósseis (d); filogenia proposta com base em seqüências de quatro genes e morfologia (e). [Retirado de CAMERON, 2004].

Conclui-se que um longo trabalho é necessário até que uma filogenia consistente entre os gêneros de Euglossini seja alcançada, visto que as cinco hipóteses levantadas na literatura são sustentadas por diferentes topologias obtidas pelo uso de diferentes dados.

Estudos Genéticos Realizados

Embora estejam disponíveis na literatura relatos a respeito da caracterização de novas espécies de Euglossini por meio de caracteres morfológicos e comportamentais, pouco se conhece sobre a genética das populações desta tribo, bem como a estrutura sociogenética de seus ninhos.

Estudos genéticos em Euglossini podem fornecer informações valiosas para a compreensão dos fatores que levam ao surgimento de sistemas sociais avançados em Apidae (lato sensu), além de auxiliar no entendimento de dados biológicos e comportamentais dessas abelhas. Os estudos genéticos podem ainda subsidiar, preferencialmente, comparações entre grupos filogeneticamente próximos com distintos sistemas sociais.

Os primeiros trabalhos enfocaram a análise cariotípica, com ênfase na determinação do número haplóide de cromossomos em espécies como *Eufriesea violacea* (GOMES *et al.*, 1998; KERR, 1952; TARELHO, 1973), *Eulaema nigrita* (POMPOLO *et al.*, 1986), *Euglossa hyacinthina* e *Euglossa cyanaspis* (ELTZ *et al.*, 1997), *Euglossa townsendi* e *Eufriesea violacea* (GOMES *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1997).

Uma segunda linha de pesquisa sobre as abelhas Euglossini tem sido a determinação de relações filogenéticas no grupo e sua relação com o surgimento de sistemas sociais em Apidae (stricto sensu), como abordado anteriormente.

Uma terceira linha de pesquisa tem investigado a ocorrência de machos diplóides em Euglossini (Figura 15). A explicação para ocorrência de tais machos nas espécies de Himenópteros panmíticos foi proposta por WHITING (1943). O modelo do sl-CSD (single locus - Complementary Sex Determination) consiste em que a hemizigose ou homozigose no loco sexual leva à formação de machos haplóides (n) e diplóides (2n), respectivamente, enquanto que as fêmeas (2n) são heterozigotas para alelos deste loco. A heterozigose neste loco leva a uma complementação gênica que ativa, na seqüência, os genes responsáveis pela

determinação do sexo em fêmeas.

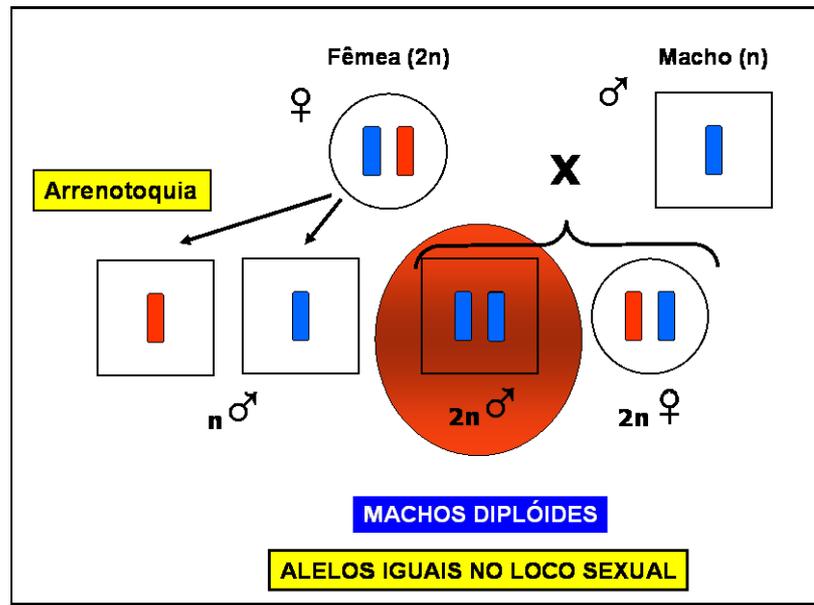


Figura 15. Esquema representando os conjuntos cromossômicos do sistema genético da haplodiploidia arrenótoca, com destaque para homozigose no loco sexual levando à formação dos machos diplóides.

Os custos para o grupo da existência de machos diplóides são altos, pois o “fitness” (vantagem ou capacidade reprodutiva) dos mesmos é quase zero, por serem completamente estéreis ou por apresentarem progênie triplóide, cuja descendência é numericamente pequena (GARÓFALO & KERR, 1975). Somente três exemplos sobre a viabilidade desses machos são conhecidos; um na vespa *Diadromus pulchellus* (ELAGOZE *et al.*, 1994); o segundo em *Euodynerus foraminatus*, uma vespa solitária (COWAN & STAHLHUT, 2004), e o terceiro na abelha *Bombus terrestris* (AYABE *et al.*, 2004).

Altas frequências desses machos foram relatadas por ROUBIK *et al.* (1996), ZAYED *et al.* (2004) e LÓPEZ-URIBE *et al.* (2007). Estes autores relataram machos diplóides com frequências entre 12-100%, 13-56% e 8-32%, respectivamente. Entretanto, DEL LAMA *et al.* (1998), PERUQUETTI (1998), TAKAHASHI *et al.* (2001) e SILVA (2002) detectaram apenas a presença de um macho diplóide em amostras de Euglossini de 23 espécies do Brasil, num total de 866 indivíduos analisados.

2. PROPOSIÇÃO E JUSTIFICATIVA

O trabalho ora realizado teve como proposição estudar alguns aspectos relevantes da biologia dos Euglossini, com ênfase nos seguintes pontos:

Qual a real frequência de machos diplóides na natureza?

A ocorrência de machos diplóides nos himenópteros tem sido verificada em espécies onde o sistema de determinação sexual envolve a partenogênese arrenótoca, e em especial grupos que apresentam sl-CSD (single locus- Complementary Sex Determination).

Os zangões diplóides são em geral mais pesados e maiores do que os haplóides. Possuem testículos pequenos, que podem ter apenas 1/10 do volume testicular de um haplóide, com poucos e curtos túbulos seminíferos em comparação com os machos haplóides. Portanto, é de se esperar que não devam ser encontrados em altas proporções nas populações naturais de abelhas em função da baixa viabilidade e fertilidade dos mesmos e dos custos do investimento parental em sua produção.

Os estudos onde altas frequências desses machos diplóides foram observados geraram especulações por parte dos autores sobre os custos de produção de machos diplóides, como provável causa da ausência da eussocialidade nos euglossíneos. Diante do exposto, estudos desta natureza apresentam grande relevância, uma vez que o estabelecimento das razões pelas quais muitos grupos de himenópteros não atingiram o estágio eussocial é fundamental para o entendimento da origem e evolução da eussocialidade.

Trabalhos prévios deste laboratório demonstraram que a elevada ocorrência de machos diplóides em Euglossini não parece ser um fenômeno generalizado, e que a frequência máxima esperada a partir do número de machos analisados e da heterozigossidade observada deve ser baixa nas populações amostradas.

Como se estruturam sociogeneticamente as colônias de Euglossini?

Ainda que se conheça em 20% das espécies de Euglossini o comportamento de nidificação, número de fêmeas responsáveis pela formação de ninhos, taxas de natalidade, e outros aspectos biológicos envolvendo indivíduos de um mesmo ninho (RAMÍREZ *et al.*, 2002), não há dados sobre a estrutura genética intranidal. A análise genética de ninhos permite esclarecer questões como parentesco entre fêmeas que ovipositam em um mesmo ninho, número de machos que acasalaram com as fêmeas e parentesco intranidal.

Com relação aos aspectos sociogenéticos, estudos prévios têm demonstrado que algumas espécies de Euglossini apresentam estágios intermediários entre a vida solitária e a eussocialidade. Entretanto, não há dados sobre o nível de organização social e sua relação com acasalamento múltiplo das fêmeas e ao grau de parentesco entre os indivíduos da colônia. Como espécies diferentes de Euglossini apresentam estágios distintos, pode ser verificado se há relação entre nível de parentesco intracolônial e o estágio social alcançado.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a investigação de aspectos da biologia e genética dos Euglossini, buscando obter dados que permitissem esclarecer as seguintes questões:

- A ocorrência de machos diplóides é um fato generalizado entre as populações de Euglossini? As causas apontadas na literatura como principais fatores desencadeadores para ocorrência de machos diplóides são observadas nas populações aqui estudadas e indicam alguma tendência?

- Qual o parentesco genético intracolonial? O grau de parentesco genético tem alguma relação com o estágio social alcançado pelas diferentes espécies?

4. DELINEAMENTO E APRESENTAÇÃO

A ferramenta mais utilizada nos trabalhos de estimativa da frequência de machos diplóides nos Euglossini foi a análise aloenzimática, através de eletroforese horizontal em gel de amido. Pelo fato de constituírem locos traduzidos, muitas das possíveis variantes são eliminadas de forma mais eficiente nos organismos haplodiplóides que nos diplodiplóides, visto que alterações que comprometam a funcionalidade de uma enzima codificada por um dado alelo num organismo haplóide não apresentam o benefício da dominância nos diplóides. A este evento é atribuída a baixa variação observada nos himenópteros quando comparados aos grupos de insetos diplodiplóides.

O uso de marcadores moleculares com maior grau de polimorfismo, não codificantes, representa uma ferramenta mais poderosa para o estudo de populações. Considerando então tais fatos, tem-se que os microssatélites do DNA nuclear constituem uma ferramenta de alto poder de resolução para essas perguntas, sendo muito provavelmente, a ferramenta mais apropriada para permitir o enfoque e a profundidade desejada no esclarecimento das questões aqui levantadas.

Os microssatélites constituem seqüências de 2-6 pares de base repetidos em tandem, têm como característica um alto grau de polimorfismo, apresentam-se distribuídos por todo o genoma e seus 'alelos' têm ação codominante (ESTOUP *et al.*, 1993).

Portanto, visando responder as questões aqui levantadas sobre a biologia e genética de populações de Euglossini, esta tese é composta pelos seguintes capítulos:

Capítulo I – **“Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae)”**.

Neste capítulo, constam o número de locos e as estratégias utilizadas para buscar marcadores do tipo microssatélites nas espécies *Euglossa cordata* e *Eulaema nigrita*, além de testes realizados em outras espécies de Euglossini;

Capítulo II – **“Microsatellite analysis demonstrates that diploid males are uncommon in euglossine bee populations from Brazil”**. Neste capítulo, com a utilização dos primers de microssatélites anteriormente desenvolvidos foi estimada a frequência de machos diplóides em 23 espécies de Euglossini, bem como as causas e conseqüências da ocorrência desses machos frente aos dados da literatura;

Capítulo III – **“Determinação da estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini com o uso de DNA microssatélite”**. Neste capítulo foi abordada a estrutura nidal de *Euglossa cordata*, *Euglossa townsendi* e *Eulaema nigrita*, relacionando a biologia dos ninhos e o parentesco intranidal.

1 **MOLECULAR ECOLOGY NOTES –**

2 doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01878.x

3

4 **Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae)**

5

6 Souza, R.O.* , Cervini, M. # , Del Lama, M.A.* and Paxton, R.J.‡

7

8 * Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros and # Laboratório de

9 Imunogenética - DNA, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal

10 de São Carlos, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

11

12 ‡ School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast

13 BT9 7BL, UK.

14

15

16 **Keywords:** Trinucleotide, SSR locus, orchid bee, Euglossini, population genetics

17

18 **Running title:** Microsatellites for orchid bees

19

20 **Corresponding Author:** Rogério O. Souza, Laboratório de Genética Evolutiva de

21 Himenópteros, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São

22 Carlos, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

23 Email: pros@iris.ufscar.br

24 Fax: (55) 16 3351-8377

1 **Abstract**

2

3 The Neotropical Euglossini (Hymenoptera: Apidae) are important pollinators of many
4 flowering plants, particularly orchids. Lack of highly polymorphic genetic markers for
5 euglossine species has limited study of their social organisation and inbreeding. We
6 therefore developed microsatellite markers for two species, *Eulaema nigrita* (11 loci)
7 and *Euglossa cordata* (9 loci), most of which were highly polymorphic in the source
8 species and in a range of related euglossine bees.

1 The Euglossini are corbiculate bees that occur in the Neotropics from 29° North to
2 32° South (Búrquez 1997). They are known as orchid bees due to the behaviour of
3 their males in collecting fragrances from the flowers of orchids (e.g. Roubik & Hanson
4 2004).

5
6 Population genetic studies benefit from molecular markers with high levels of
7 heterozygosity. To date, however, studies of the intracolony sociogenetic structure,
8 population genetic structure and inbreeding in euglossine bees have been limited to
9 the use of allozymes of low variability (Roubik *et al.* 1996, Takahashi *et al.* 2001). We
10 therefore developed primers flanking microsatellite repeat motifs for two
11 characteristic euglossine species, *Euglossa cordata* and *Eulaema nigrita*, both with a
12 wide distributional range in Brazil. In brief, total DNA was extracted from a single
13 male thorax (one per species) preserved in alcohol using phenol/chloroform. Two
14 300 – 800bp partial genomic libraries were constructed, one for *E. cordata* and one
15 for *E. nigrita*, following Piertney *et al.*'s (1998) microsatellite enrichment protocol,
16 enriching for CTT/GAA repeat motifs. Selected fragments were ligated into the
17 plasmid vector pUC19/*Bam*HI (Q-Biogene), then plasmids were cloned into XL-2
18 Blue MRF' Ultracompetent Cells (Stratagene).

19
20 Clones were screened with DIG-end labelled (GAA)₁₀ or (CTT)₁₀ (Estoup & Turgeon
21 1996) and positive clones were sequenced using BigDye terminator chemistry
22 (Applied Biosystems) on an ABI 3130 automatic sequencer. Primers were designed
23 using the program Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi),
24 resulting in 26 microsatellite loci, 13 for *E. nigrita* and 13 for *E. cordata*.

1 Samples for PCR tests were extracted from male and female legs following a high-
2 salt protocol (Paxton *et al.* 1996). Fluorescently end-labelled PCR products were
3 generated in an Eppendorf Mastercycler using 250 μM of each dNTP, 2.5 mM of
4 MgCl_2 , 1.0 μM of each primer, 1.0 X Invitrogen Buffer, 1.0 U of Platinum *Taq* DNA
5 polymerase (Invitrogen) in a 10.0 μL final volume. All PCR profiles comprised 30
6 cycles of 30 s at 94° C for denaturation, 20 s at 56° C for annealing, 1 min at 72° C
7 for extension, and a final extension step of 10 min at 72° C. Products were resolved
8 in a MegaBACE – 750 (GE - Applied BioSystems) fragment analyser. All statistical
9 analyses were performed using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995).

10

11 From the 26 loci, two of 13 in *E. nigrita* (EF451839, EF451840) and four of 13 in *E.*
12 *cordata* (EF451850, EF451851, EF451852, EF451853) were monomorphic. The
13 other 11 loci in *E. nigrita* and nine loci in *E. cordata* showed high levels of
14 polymorphism and expected heterozygosity (Table 1). We found one GCCA (*E.*
15 *nigrita*) and one CT (*E. cordata*) microsatellite repeat motif; others containing the
16 expected repeat motif, GAA/CTT (Table 1). Loci did not exhibit linkage disequilibrium
17 and no significant departures from Hardy Weinberg equilibrium were observed when
18 the loci were used to amplify DNA from the source species for which they had been
19 developed. All individuals generated at least one allele at each locus and therefore
20 there was no evidence of null alleles in that non-amplifying individuals, potential null
21 allele homozygotes (females) or hemizygotes (males) were not detected. Loci were
22 also useful in amplifying DNA of other euglossine species (Table 2).

23

24 The microsatellite loci we have designed will be a useful tool to answer topical
25 questions in euglossine biology such as effective population size in species with

1 complementary sex determination (Zayed 2004), diploid male production and the
2 decline of pollinators (Takahashi *et al.* 2001, Zayed *et al.* 2003), the loss of genetic
3 variation and its relation with foraging specialisation versus generalisation (Packer *et*
4 *al.* 2005).

1 **Acknowledgments**

2

3 We thank J.C. Serrano and E.J. dos Anjos Silva for species identification;
4 M.M. López-Uribe, C.A. Oi and C.F. Martins for help in sampling; EMBRAPA
5 Pecuária Sudeste, Parque Ecológico de São Carlos and Canil Municipal de São
6 Carlos for permission to sample bees in their areas; special thanks to IBAMA (Dr.
7 Helena K. Boscolo) for the licence to collect and transport the material; to the
8 members of Universidade Federal de São Carlos and Queen's University Belfast for
9 support; to CNPq (Edital Universal 475935/04-7); and to CNPq (n^o 142131/03-2) and
10 CAPES (BEX- 218204/1) for a scholarship to ROS.

11

12

1 **References**

2

3 Búrquez A (1997) Distributional limits of euglossine and meliponine bees
4 (Hymenoptera: Apidae) in northwestern Mexico. *Pan-Pacific Entomologist*, **73**,
5 137-140.

6 Estoup A, Turgeon J (1996) Microsatellite marker isolation with non-radioactive
7 probes and amplification. Version 12/1996, available at
8 <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>

9 Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics.
10 *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.

11 Packer L, Zayed A, Grixiti JC, Ruz L, Owen RE, Vivallo F, Toro H (2005)
12 Conservation genetics of potentially endangered mutualisms: reduced levels
13 of genetic variation in specialist versus generalist bees. *Conservation Biology*,
14 **19**, 195-202.

15 Paxton RJ, Thoren PA, Tengo J, Estoup A, Pamilo P (1996) Mating structure and
16 nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera,
17 Andrenidae), using microsatellites. *Molecular Ecology*, **5**, 511-519.

18 Piertney SB, MacColl ADC, Bacon PJ, Dallas JF (1998) Local genetic structure in red
19 grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): evidence from microsatellite DNA
20 markers. *Molecular Ecology*, **7**, 1645-1654.

- 1 Roubik DW, Hanson PE (2004) *Orchid Bees of Tropical America*. Instituto Nacional
2 de Biodiversidad, Costa Rica.
- 3 Roubik D, Weigt LA, Bonilla MA (1996) Population genetics, diploid males, and limits
4 to social evolution of euglossine bees. *Evolution*, **50**, 931-934.
- 5 Takahashi NC, Peruquetti RC, Del Lama MA, Campos LAO (2001) A reanalysis of
6 diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae).
7 *Evolution*, **55**, 1897-1899.
- 8 Zayed A (2004) Effective population size in Hymenoptera with complementary sex
9 determination. *Heredity*, **93**, 627-630.
- 10 Zayed A, Roubik DW, Packer L (2003) Use of diploid male frequency data as an
11 indicator of pollinator decline. *Proceedings of the Royal Society of London B* ,
12 **271**, S9-S12.

Table 1. Details of the 20 microsatellite loci developed for *Eulaema nigrita* (Eln) and *Euglossa cordata* (Egc) from Brazil (one population of each species), with 23 *E. nigrita* females (diploid) and 134 *E. cordata* individuals (67 haploid males and 67 diploid females) analyzed.

Locus Fluorophore	Repeat motif in clone and length (bp)	Primer sequence	Range (bp)	N_A	H_O	H_E	GenBank Number
Eln 1 FAM	(GAA) ₈ 210	F 5'- GGGGTATGGAACGAGACAAA -3' R 5'- GATGGCGAGCACGATAATCT -3'	204 - 226	8	0.76	0.81	EF451828
Eln 12a TET	(GAA) ₆ 298	F 5'- AGGCATGTTCTTCTTCTGGT -3' R 5'- AACGAGTGACGGAGAACGAG-3'	286 - 303	7	0.68	0.78	EF451829
Eln 12b HEX	(GCCA) ₁₀ 209	F 5'- GGCAAGCACAAGCAAGTAAG -3' R 5'- GGCAGCGGTGTAACAGAAG -3'	189 - 209	5	0.68	0.64	EF451830
Eln 13 FAM	(CTT) ₈ 150	F 5'- CTGCGCCATTTCTGCTCT -3' R 5'- GCATTACTGTAACGGGAACCA -3'	142 - 170	9	0.77	0.82	EF451831
Eln 2J TET	(CTT) ₇ 186	F 5'- CAAGCGTCGCGATTGTTAT -3' R 5'- TCAGGAGTCACGTTCCATCA-3'	179 - 217	8	0.73	0.78	EF451832
Eln 5J HEX	(GAA) ₈ 155	F 5'- TCTTCCACTCTCGACCTCGT -3' R 5'- TGCCTCGGATGGACTAGTTT-3'	131 - 179	10	0.62	0.72	EF451833
Eln 7J FAM	(CTT) ₁₂ 158	F 5'- TCCTTCGGTCCCCTATTAAA -3' R 5'- CCGAGTGAAATCGAATGGAG -3'	136 - 166	9	0.68	0.79	EF451834
Eln 10J FAM	(CTT) ₈ 249	F 5'- ATTCTCTGCTCCCCCTTTGT -3' R 5'- TACCTACGCGAGACGAGACA -3'	227 - 269	11	0.86	0.92	EF451835
Eln 12J HEX	(GAA) ₆ 243	F 5'- AACGGGCAACGTAACCATAG -3' R 5'- GCTCGTTCACCATCTTCGTT -3'	173 - 254	11	0.67	0.85	EF451836
Eln 18J FAM	(CTT) ₉ 186	F 5'- GCTTTTCCCTTTTCGCTCTCT -3' R 5'- AACGGGAGGCGATAAAAACT -3'	178 - 193	5	0.76	0.70	EF451837
Eln 19J TET	(GAA) ₁₄ 169	F 5'- ATAAAGCTACGACGCGAGGA -3' R 5'- CCTGGCATTTCGGTTAGGTTA -3'	154 - 208	17	0.82	0.92	EF451838

Egc 17 FAM	(GAA) ₁₁ 228	F R	5'- AGAGGAGGGTCCAGGAAAGA -3' 5'- ACCAGGCGTTCTCATCAAGT -3'	199 - 246	16	0.73	0.83	EF451841
Egc 18 FAM	(GAA) ₉ 166	F R	5'- TGATACAGGTCGGCGTAAAA -3' 5'- GGTAACCTCCGTCGCGAACTA -3'	158 - 197	18	0.83	0.92	EF451842
Egc 24 FAM	(GAA) ₆ 210	F R	5'- AGGAGAACCGAACAGCGATA -3' 5'- CCGAGCTTTTTCTTCCCTCT -3'	192 - 210	11	0.45	0.65	EF451843
Egc 26 HEX	(CTT) ₅ 163	F R	5'- GCCGAACAAACATCTCGTCT -3' 5'- CGGAACTTTGATATCGTCGAG -3'	160 - 188	21	0.70	0.82	EF451844
Egc 30a FAM	(GAA) ₇ 151	F R	5'- ATGCCAAGCAAAGTTTCCAA -3' 5'- GAAAATTTCTCAGCCATTTCAA -3'	123 - 166	7	0.94	0.85	EF451845
Egc 30b HEX	(CT) ₁₂ 116	F R	5'- CGAATCTTGAAATGGCTGAGA -3' 5'- ACACCGCGAGAGCGAGAG -3'	87 - 152	35	0.86	0.89	EF451846
Egc 35 TET	(GAA) ₇ 172	F R	5'- GATCACGAAACGGTGTAAGTC -3' 5'- CTTTCTTCGGATTCCGACTG -3'	156 - 174	6	0.80	0.87	EF451847
Egc 37 TET	(CTT) ₆ 176	F R	5'- ATCCTCCTCTTCGTGGTCCT -3' 5'- GGCAAACTTCCGCTTGATA -3'	145 - 223	24	0.48	0.51	EF451848
Egc 51 HEX	(CTT) ₆ 220	F R	5'- GGAATGGGATTCATTCAGCA -3' 5'- CGAAAGGTCGACAAACCAAT -3'	192 - 232	10	0.49	0.54	EF451849

F and R forward and reverse primers, respectively (F was fluorescently labelled); N_A , number of alleles;

H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; *E. cordata* H_O and H_E estimates used females only.

Table 2. Results of cross-species amplification using microsatellite primers designed for *Euglossa cordata* (9 loci, Egc) and *Eulaema nigrita* (11 loci, Eln) in 23 species of euglossine bees.

Sp	N	Number of alleles per locus, expected heterozygosity [allele range in bp]								
		Egc 17	Egc 18	Egc 24	Egc 26	Egc 30a	Egc 30b	Egc 35	Egc 37	Egc 51
1	17m	5 - 0.80 [214-235]	4 - 0.65 [176-185]	3 - 0.65 [208-211]	1 [172]	1 [157]	-	2 - 0.23 [168-171]	7 - 0.62 [176-216]	2 - 0.32 [223-226]
2	19m	6 - 0.56 [205-226]	9 - 0.72 [183-213]	1 [190]	2 - 0.39 [172-175]	1 [160]	-	5 - 0.38 [168-171]	5 - 0.72 [157-170]	3 - 0.56 [215-223]
3	1m	1 [218]	1 [179]	1 [210]	1 [173]	1 [126]	1 [116]	1 [174]	1 [170]	1 [220]
4	see	Table 1								
5	7m	4 - 0.69 [220-237]	5 - 0.78 [182-194]	4 - 0.61 [201-207]	4 - 0.61 [167-176]	-	7 - 0.86 [89-129]	2 - 0.25 [168-171]	3 - 0.24 [148-163]	2 - 0.25 [223-226]
6	30m	6 - 0.75 [202-220]	11 - 0.81 [180-215]	1 [190]	2 - 0.46 [172-175]	-	-	5 - 0.74 [168-180]	6 - 0.77 [151-166]	2 - 0.50 [208-215]
7	1m	1 [209]	1 [181]	1 [190]	1 [175]	-	-	-	1 [157]	1 [225]
8	95m	11 - 0.86 [203-234]	8 - 0.66 [197-224]	2 - 0.67 [173-179]	1 [165]	-	-	-	10 - 0.77 [143-186]	1 [236]
9	8m	6 - 0.81 [220-240]	5 - 0.78 [198-217]	6 - 0.78 [192-204]	3 - 0.41 [164-168]	3 - 0.63 [154-166]	8 - 0.88 [91-112]	2 - 0.32 [171-174]	5 - 0.78 [154-166]	3 - 0.57 [223-229]
10	3m	2 - 0.44 [218-224]	1 [168]	1 [210]	1 [174]	2 - 0.44 [129-160]	3 - 0.67 [112-127]	2 - 0.44 [174-177]	2 - 0.44 [160-166]	1 [220]
11	1m	1 [220]	1 [187]	1 [189]	1 [173]	-	-	1 [171]	1 [156]	1 [219]
12	4m	3 - 0.63 [211-223]	3 - 0.63 [162-183]	2 - 0.38 [196-204]	3 - 0.63 [164-173]	4 - 0.63 [144-150]	4 - 0.75 [88-119]	3 - 0.63 [159-168]	4 - 0.75 [179-210]	3 - 0.63 [220-226]
13	8m	3 - 0.66 [217-223]	6 - 0.63 [182-205]	3 - 0.59 [200-207]	2 - 0.38 [170-173]	3 - 0.67 [130-151]	7 - 0.86 [85-134]	2 - 0.22 [168-171]	5 - 0.75 [148-223]	2 - 0.47 [223-226]
14	4m	3 - 0.63	4 - 0.75	2 - 0.50	3 - 0.63	1	2 - 0.50	2 - 0.38	3 - 0.63	3 - 0.63
	2f	[217-229]	[182-199]	[190-204]	[170-182]	[163]	[120-121]	[168-171]	[147-163]	[220-226]

15	10m	6 - 0.78 [214-232]	5 - 0.74 [180-198]	3 - 0.58 [190-204]	6 - 0.76 [170-185]	-	1 [104]	2 - 0.42 [168-171]	5 - 0.78 [151-176]	3 - 0.34 [220-226]		
16	1m	1 [231]	1 [184]	1 [199]	1 [179]	1 [161]	1 [120]	1 [174]	1 [163]	1 [230]		
17	2m	1 [224]	1 [183]	-	-	1 [155]	-	1 [226]	1 [155]	-		
18	2m	1 [224]	1 [183]	-	-	1 [153]	-	1 [226]	2 - 0.50 [149-153]	-		
19	2m	1 [209]	1 [181]	-	-	1 [153]	-	1 [226]	1 [153]	-		
20	2m	2 - 0.50 [224-241]	1 [182]	1 [195]	-	1 [153]	-	1 [226]	1 [153]	-		
21	53m	10 - 0.85 [215-256]	11 - 0.83 [215-256]	-	-	-	-	-	1 [144]	2 - 0.29 [230-233]		
22	8m	5 - 0.83 [229-241]	1 [215]	-	-	-	-	-	1 [156]	-		
23	51m 3f	10 - 0.83 [203-238]	1 [215]	-	-	-	-	-	1 [156]	1 [205]		
Sp	N	Eln 1	Eln 12a	Eln 12b	Eln 13	Eln 2J	Eln 5J	Eln 7J	Eln 10J	Eln 12J	Eln 18J	Eln 19J
1	2m	-	1 [250]	-	1 [139]	1 [194]	-	1 [177]	-	-	1 [279]	1 [177]
2	2m	-	1 [252]	-	1 [139]	1 [186]	-	2 - 0.50 [182-188]	1 [252]	-	1 [273]	1 [206]
3	1m	-	1 [250]	-	1 [139]	1 [190]	-	1 [220]	1 [249]	-	1 [279]	1 [220]
4	2m	-	2 - 0.50 [244-247]	-	1 [139]	2 - 0.50 [194-197]	-	2 - 0.50 [175-178]	1 [247]	-	1 [279]	2 - 0.50 [175-178]
5	2m	-	1 [244]	-	1 [139]	1 [190]	-	1 [191]	-	-	1 [279]	1 [170]
6	2m	-	1 [186]	1 [252]	1 [139]	-	-	1 [200]	-	1 [213]	1 [272]	-
7	1m	-	1 [246]	-	1 [139]	1 [194]	-	1 [205]	-	-	1 [268]	1 [205]
8	95m	-	1 [246]	2 - 0.15 [190-198]	2 - 0.52 [139-148]	-	-	1 [184]	-	-	6 - 0.60 [274-292]	15 - 0.89 [170-207]

9	2m	-	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1
			[246]		[139]			[184]			[278]	[170]
10	2m	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	2 - 0.50
			[249]		[139]	[190]		[202]			[280]	[199-202]
11	1m	1	1	-	1	1	-	1	1	-	-	1
		[229]	[294]		[151]	[205]		[203]	[244]			[171]
12	2m	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	2 - 0.50
			[247]		[139]	[193]		[213]			[279]	[173-178]
13	2m	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	1
			[244]		[139]	[190]		[187]			[279]	[173]
14	2m	-	1	-	1	1	-	1	-	-	-	-
			[250]		[139]	[190]		[187]			-	-
15	2m	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	1
			[244]		[139]	[190]		[184]			[279]	[184]
16	1m	-	1	-	-	1	-	1	1	-	1	1
			[244]			[190]		[184]	[244]		[279]	[220]
17	21m	3 - 0.67	7 - 0.88	5 - 0.72	3 - 0.68	10 - 0.88	7 - 0.89	9 - 0.90	10 - 0.91	6 - 0.67	14 - 0.93	8 - 0.90
		[207-220]	[269-295]	[202-234]	[157-163]	[194-231]	[132-200]	[164-187]	[225-262]	[229-259]	[186-238]	[178-203]
18	8m	6 - 0.81	5 - 0.75	4 - 0.66	1	5 - 0.69	2 - 0.47	-	3 - 0.53	1	1	2 - 0.47
		[205-226]	[288-295]	[202-222]	[151]	[218-242]	[171-174]		[237-243]	[229]	[205]	[171-174]
19	26m	1	6 - 0.74	7 - 0.74	3 - 0.27	6 - 0.75	2 - 0.50	8 - 0.80	4 - 0.67	7 - 0.78	8 - 0.90	7 - 0.79
		[207]	[274-283]	[206-234]	[156-160]	[194-222]	[185-191]	[170-192]	[226-235]	[245-259]	[202-265]	[171-206]
20	see	Table 1										
21	53m	-	7 - 0.65	3 - 0.50	1	3 - 0.48	-	4 - 0.56	5 - 0.68	5 - 0.56	4 - 0.42	4 - 0.37
			[276-294]	[199-207]	[154]	[200-211]		[160-172]	[228-249]	[249-263]	[217-229]	[216-228]
22	8m	-	-	3 - 0.65	1	1	1	-	-	-	-	5 - 0.78
				[211-219]	[138]	[193]	[190]					[222-261]
23	51m	-	-	9 - 0.81	1	1	1	1	-	-	-	8 - 0.79
	3f	-	-	[194-215]	[138]	[194]	[190]	[156]	-	-	-	[216-264]

-, no resolvable product; m, haploid males; f, diploid females. Expected heterozygosity only given for >1 allele per locus.

Species: 1 *Euglossa annectans*; 2 *Eg. chalybeata*; 3 *Eg. cognata*; 4 *Eg. cordata*; 5 *Eg. fimbriata*; 6 *Eg. imperialis*; 7 *Eg. intersecta*; 8 *Eg. mandibularis*; 9 *Eg. melanotricha*; 10 *Eg. mixta*; 11 *Eg. moure*; 12 *Eg. pleosticta*; 13 *Eg. securigera*; 14 *Eg. townsendi*; 15 *Eg. truncata*; 16 *Eg. viridis*; 17 *Eulaema bombiformis*; 18 *El. cingulata*; 19 *El. meriana*; 20 *El. nigrita*; 21 *Eufriesea violacea*; 22 *Exaerete frontalis*; 23 *Ex. smaragdina*.

1 MICROSATELLITE ANALYSIS DEMONSTRATES THAT DIPLOID
2 MALES ARE UNCOMMON IN EUGLOSSINE BEE POPULATIONS
3 FROM BRAZIL

4

5 Souza, R.O.* , Cervini, M. # , Mortari, N. # , Paxton, R.J.¥ and Del Lama, M.A.*

6

7 * Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros and # Laboratório de
8 Imunogenética - DNA, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal
9 de São Carlos, C.P. 676, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

10 ¥ School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast
11 BT9 7BL, UK.

12

13

14 **Keywords:** Diploid Males, Euglossine bees, Hymenoptera, Microsatellites.

15

16 **Corresponding Author:** Rogério O. Souza, Laboratório de Genética Evolutiva de
17 Himenópteros, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São
18 Carlos, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

19 **Email:** pros@iris.ufscar.br

20 **Fax:** (55) 16 3351-8377

1 **ABSTRACT**

2 Diploid (2N) males can be observed in haplodiploid Hymenopteran species with
3 complementary sex determination (CSD) as a consequence of homozygosity at the sex
4 locus/loci that drives a diploid zygote to develop to male instead of female. The
5 frequency of 2N males may therefore be a readily measurable indicator of the genetic
6 health of these economically and ecologically important insects. Past allozyme-based
7 studies of 2N male frequencies in one group of Hymenopterans, the Neotropical
8 ‘orchid’ or euglossine bees, have been contradictory whilst recent allozyme-based
9 analysis of one orchid bee species from Panama has suggested that it suffers from
10 extremely high 2N frequencies associated with high *Fst* and low *Ne* (Zayed *et al.*
11 2004). Using highly polymorphic microsatellite loci to reveal ploidy, we detected only
12 two diploid males (one in each of *Euglossa annectans* and *Euglossa mandibularis*) of
13 483 males belonging to 23 euglossine bee species sampled in Brazil and Colombia.
14 Despite analysis of species occupying different and often highly fragmented habitat
15 types, we believe that South American euglossine bee populations are not subjected to
16 high levels of inbreeding and show genetic health incompatible with the idea of
17 bottlenecking and consequential inbreeding.

18

19

20

21

22

23

1 INTRODUCTION

2 Arrhenotokous haplodiploidy is a common reproductive system in nearly 20%
3 of animal species (Cowan and Stahlhut, 2004), where males developed from
4 unfertilized eggs and females from fertilized ones. Its advantages include the ability of
5 females to control the sex ratio and invest in the sex that promotes higher fitness for a
6 given investment.

7 At the genic level, the mechanism of sex determination of the majority of
8 haplodiploid Hymenoptera (ants, bees and wasps) is believed to be single-locus
9 complementary sex determination (sl-CSD; van Wilgenburg *et al.* 2006), a
10 mechanism first proposed by Whiting (1943). According to the sl-CSD model,
11 females are heterozygous and males are hemizygous (haploid) or homozygous
12 (diploid) at the sex locus. Other sex determination mechanisms have been proposed
13 such as multilocus-CSD (Snell, 1935), especially for parasitic or inbreeding wasp
14 species (Cook, 1993), genic balance (Cunha and Kerr, 1957), and genetic imprinting
15 (Dobson and Tanouye, 1998), though these models either have poor theoretical
16 grounding, have little empirical support or have a limited taxonomic distribution
17 within the Hymenoptera (van Wilgenburg *et al.* 2006).

18 Diploid males in sl-CSD Hymenopteran species are usually considered
19 infertile due to a non-reduction from diploidy of their sex cells during meiosis.
20 Consequently, they father triploid progeny, increasing the genetic load to their parents
21 (Cook and Crozier, 1995). The occurrence and cost of diploid males is reduced by
22 various strategies such as inbreeding avoidance and polyandry respectively; the latter
23 reduces the variance in 2N male production by a female (Cook and Crozier, 1995). In
24 *Apis cerana* diploid males are eaten on hatching (Hoshihara *et al.*, 1981; Woyke, 1979),
25 and in *Apis mellifera* diploid males are killed up to their third day of larval life

1 (Woyke, 1979), reducing their load on these eusocial honey bees. Male diploidy may,
2 however, be useful in biological control (Stouthamer *et al.*, 1992). Few examples of
3 functionally reproductive 2N males have been reported, namely in the wasp
4 *Diadromus pulchellus* (Elagoze *et al.*, 1994) where 1% of the 2N males were fertile
5 and in the highly inbred solitary mason wasp *Euodynerus foraminatus* (Cowan and
6 Stahlhut, 2004), in *Bombus terrestris* bee (Ayabe *et al.*, 2004) and in paper wasps
7 *Polistes chinensis antennalis* (Tsuchida *et al.*, 2002) and *Polistes dominulus* (Liebert
8 *et al.*, 2005). However, only in *E. foraminatus* is there evidence that 2N males can
9 produce haploid sperm and fertile grandchildren (Cowan and Stahlhut, 2004).

10 It has recently been argued that sl-CSD may lead to a decrease in effective
11 population size as a consequence of diploid male production, and that diploid males
12 may therefore be used as sensitive indicators of population viability (Zayed *et al.*,
13 2004; Zayed and Packer, 2005; Zayed and Packer, 2001). In support of this view,
14 diploid male frequencies from 8-100% have been reported by Roubik *et al.* (1996),
15 Zayed *et al.* (2004) and López-Uribe *et al.* (2007) in orchid bee species from Panama
16 and Colombia, assessed using allozyme markers. This contrasts with the allozyme-
17 based findings of Takahashi *et al.* (2001), in which a single individual out of 542
18 orchid bees from Brazil was diploid. Controversy over these differences arises due to
19 the low resolving power (low polymorphism) and difficulty in scoring allozymes and
20 due to idiosyncrasies of the biology of the species employed in each study (Roubik,
21 2001).

22 For the first time we examined diploid male frequencies among 23 euglossine
23 bee species from various areas of Brazil and Colombia using novel, highly variable
24 microsatellite loci designed for *Euglossa cordata* (nine loci) and *Eulaema nigrita*
25 (eleven loci) (Souza *et al.* 2007; see Table 1) to determine ploidy of males. This

1 approach overcomes the pitfalls that arise from allozyme-based analyses such as
2 genetic non-detection of 2N males and allele mis-scoring. In addition, our analysis of
3 23 species (ca. 10% of the world's orchid bee fauna, see Roubik and Hanson, 2004)
4 ensures coverage of a range of species with differing population biologies, habitat
5 preferences and therefore with differing exposure to habitat fragmentation.

6

7 **MATERIALS AND METHODS**

8 Adult males of 23 euglossine bee species (n = 483) were collected in six states
9 of Brazil (Amazonas – AM; Minas Gerais – MG; Mato Grosso – MT; Paraíba – PB;
10 Rio de Janeiro – RJ; and São Paulo – SP) and Villavicencio, Colombia, using
11 chemical bait compounds (cineole, skatole and vanillin). Females (n = 93) of four
12 species were simultaneously collected in flowers. After collection, samples were kept
13 at – 20°C until analysis.

14 Total DNA was extracted from legs of males following a high-salt protocol
15 (Paxton *et al.*, 1996). PCRs were performed using fluorescently labeled primers
16 described in Table 1 (Souza *et al.*, 2007) in a Eppendorf Mastercycler, with 250 μ M
17 of each dNTP, 2.5 mM of MgCl₂, 1.0 μ M of each primer, 1.0 X Buffer, 1.0 U of
18 Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 1.0 μ L of extracted DNA in a 10 μ L
19 final volume. PCR profiles were: 30 cycles of 30 seconds at 94° C for denaturing; 20
20 seconds at 56° C for annealing; 1 minute at 72° C for extension; and a final step of 10
21 minutes at 72° C. PCR products were diluted and resolved in a MegaBACE – 750 (GE
22 - Applied BioSystems) sequencer.

23 Primers designed for *Euglossa cordata* and *Eulaema nigrita* were in Hardy
24 Weinberg equilibrium and not in linkage disequilibrium for the species from which
25 they had been developed (Souza *et al.* 2007). The *Eg. cordata* loci were used to

1 analyse 16 *Euglossa* spp. and the *El. nigrita* loci were used to analyse 4 *Eulaema*
2 species (Table 1). For *Eufriesea violacea*, *Exaerete frontalis* and *Exaerete*
3 *smaragdina*, all primers with a clear amplification product were employed. For *Eg.*
4 *mandibularis*, loci of *El. nigrita* were also used due to the low number of alleles or
5 lack of amplification using loci developed for *Eg. cordata*.

6 Males with a diploid pattern for any locus were re-amplified and, if diploid
7 again, the DNA of another leg of the same individual was extracted and then
8 reanalysed as described above. Diploidy was detected in 2 males at 2 loci each; every
9 extraction and amplification gave the same diploid pattern. Diploid male frequencies
10 were estimated using (Owen and Packer, 1994) ML algorithm, assuming sl-CSD.
11 Allele frequencies, population differentiation and *F_{st}* were estimated using
12 GENEPOP (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>) v 3.4 (Raymond and Rousset,
13 1995) and FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 1995) assuming males with only one allele at
14 all loci to be haploid, and mean expected heterozygosity across loci was calculated by
15 hand. Linkage disequilibrium was also tested in all populations with more than 17
16 males (Table 2) using FSTAT. Female samples (*Eg. cordata*, n = 66; and *El. nigrita* n
17 = 22) were used to estimate effective population size (*N_e*) using OneSamp software
18 (Tallmon *et al.* 2004), whilst population differentiation (including *Eg. cordata* and *Ef.*
19 *violacea* males) and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium of females were
20 tested with FSTAT.

21

22 **RESULTS**

23 The number of loci used per species ranged from 6 to 13, and on average 7.68
24 loci were polymorphic (Table 1). Assuming H-W equilibrium, the expected intralocus
25 heterozygosity ranged from 0.15 in *Eg. mandibularis* (Locus Egc 26) to 0.94 in *Eg.*

1 *cordata* (Locus Egc 30b), and the expected mean heterozygosity ranged from 0.24 in
2 *Ex. smaragdina* to 0.82 in *El. bombiformis*. The chance to detect a heterozygous male,
3 if diploid, at least at one locus was greater than 94% in all species (Table 2) and
4 usually >99%, demonstrating the high variability of the loci and their utility to assign
5 ploidy to an individual.

6 Two diploid males out of 483 males sampled were observed across the 23
7 species analyzed (Table 2), one male in *Euglossa annectans* (5.8%) and the second in
8 *Euglossa mandibularis* (1.0%); the 2N male in this latter species had formerly been
9 identified as diploid on the basis of allozyme loci by Takahashi *et al.* (2001).
10 Considering that the probability of detection a diploid male is close to one for almost
11 all analyzed species, the expected maximum frequency of 2N males was $\leq 5\%$ of
12 males for all 8 species with more than 18 males analysed. This means that, if diploid
13 males are captured depending only on their frequency and disregarding any other
14 parameter which could affect their sampling, the expected maximum frequency of 2N
15 males did not reach 6% using these markers and in this way, 20 individuals will be
16 sufficient for a good estimate of 2N males frequency, if they are truly random
17 sampled.

18 No population differentiation (São Carlos vs. Viçosa) was observed for *Ef.*
19 *violacea* males across 11 loci ($F_{st} = -0.024$, CI 95% $-0.031 - -0.018$). On the other
20 hand results for *Eg. cordata* males demonstrated a subtle yet significant difference
21 (Caraguatatuba vs. São Carlos) across 9 loci ($F_{st} x = 0.015$, CI 95% $-0.008 - 0.032$).
22 No significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium were detected in *Eg.*
23 *cordata* or *El. nigrita* female populations. *Eg. cordata* males collected in a forest
24 fragment nearby and females sampled when visiting *Thevetia peruviana* flowers

1 inside the city of São Carlos showed no significant population differentiation ($F_{st} =$
2 0.016, 95% CI 0.012 – 0.036).

3 An N_e of 78.4 (CI 95% 71.4 – 87.5) and 23.4 (CI 95% 21.5 – 25.9) was found
4 for *Eg. cordata* and *El. nigrita* females, a very close value of their respective sample
5 size. Several runs of this Bayesian software using subsets (randomly chosen) of 17
6 individuals of *El. nigrita* from the original data set, showed results close to sample
7 size used (usually 17) reflecting a good repeatability of data subsets.

8

9 **DISCUSSION**

10 Among 483 males sampled, 340 males from 10 new species (comparing to
11 Takahashi *et al.*, 2001) (*Exaerete* 1; *Eulaema* 2; *Euglossa* 7) were analysed for the
12 first time and 143 males were previously analysed by Takahashi *et al.* (2001). The *Eg.*
13 *mandibularis* 2N male was the same reported by them and even expanding from 19 to
14 95 males analyzed only this occurred in the new sample. Microsatellite analysis
15 identified one 2N male in the *Eg. annectans* sample that was not identified by the
16 previous allozymes analysis. As the misscoring was less than 1% between the two
17 analyses we prefer to extend our analyses to new samples from other geographical
18 origins, than to submit the entire Takahashi *et al.* (2001) sample to reanalysis.

19 As expected, microsatellite analysis was a very powerful way to detect 2N
20 males due to their high intraloci heterozygosities. All Euglossini species studied
21 showed a chance to detect a heterozygous male, if diploid, for at least one locus
22 greater than 94%. But, if we compare the previous study with allozyme markers
23 (Takahashi *et al.* 2001) and the present results, the scenario is the same – diploid
24 males are uncommon in all Brazilian populations analyzed. Considering that the
25 results are similar, pooling together the data from Takahashi *et al.* (2001) and our

1 findings, 883 males of 26 species of four of the five genera of this tribe were analyzed
2 and only two diploid males were found.

3 Even in a cleptoparasitic species like *Exaerete*, which is expected to have a
4 lower population size than others Euglossini species, 2N males were not found. This
5 is a good indication that its usurpation behaviour is not contributing to a *Ne* reduction
6 and inbreeding.

7 Our samples came from the Northeast and Southeast coast line where Atlantic
8 forest is the original vegetation, from the Center region where cerrado is the
9 predominant vegetation and from Amazon basin (Amazon forest), with its complex
10 fauna and flora. All these environments are under different kinds of human activities
11 like wood exploration, crops, cattle ranching and many other extractive activities.
12 Even in highly disturbed areas as the surroundings of São Carlos city, where a
13 reduction of the original vegetation was estimated as 94.4% in favour to sugar-cane
14 monoculture (Soares *et al.*, 2003), a single 2N male (*Eg. annectans*) was found among
15 94 males from 9 species.

16 Female analysis provided a partial picture of genetic structure and state of health
17 of *El. nigrita* and *Eg. cordata* populations. The absence of significant departures of
18 Hardy-Weinberg equilibrium indicates low inbreeding levels. Mark and recapture
19 studies and genetical analysis through mitochondrial and allozymes markers in these
20 two species inside urban areas (López-Uribe, 2006) showed a low dispersion of
21 females among patches of trees and different dispersion patterns for females
22 (phylopatric) and males (dispersive sex) collected in flowers from different sampling
23 sites. Considering these different behaviours (philopatry vs. dispersion), male
24 mobility is certain an important key to keep outbreeding at levels that avoid 2N male
25 production.

1 As the foraging areas and flight for mating are not necessarily overlapped events
2 is not a surprise that even with a small estimated N_e , especially in *El. nigrita* ($N_e =$
3 23.4), no diploid male was found. As N_e was estimated using females, this number
4 just reflects the dispersion pattern in urban areas mentioned above. By the way, close
5 value between number of females analysed and N_e estimates for *El. nigrita* and *Eg.*
6 *cordata* means that the real N_e is higher considering a conservative model used
7 (Tallmon *et al.* 2004) and specially the strategy used to collecting females inside
8 flowers (more phylopatric sex according López-Uribe . 2006).

9 The F_{st} values provided evidence of high gene flow levels in *Ef. violacea* (two
10 populations 530 km apart), but not in *Eg. cordata* (populations 300 km apart).
11 Although being expected a higher flight ability of the bigger bees, these F_{st} values
12 should be analysed carefully, because only *Eg. cordata* value was estimated with
13 species-specific microsatellite loci, and the accuracy of the estimate should be smaller
14 in *Ef. violacea* population (heterologous primers).

15 No linkage disequilibrium was found in male samples involving all 10 tested
16 species (*Eg. annectans*, *Eg. chalybeata*, *Eg. cordata*, *Eg. imperialis*, *Eg.*
17 *mandibularis*, *El. bombiformis*, *El. meriana*, *El. nigrita*, *Ef. violacea* and *Ex.*
18 *smaragdina*). This result indicates that our data have no familial structure, and it is a
19 strong evidence that the males of different species we have caught are truly random
20 samples.

21 According to the sl-CSD model, diploid males will be generated if a matched
22 mating occurs, and this is proportional to the number of sex alleles in a given
23 population (Cook and Crozier, 1995). Assuming that sex alleles have similar
24 frequencies in a population (they are maintained by frequency-dependent selection),

1 the expected number of these alleles in *Euglossa mandibularis* and *Euglossa*
2 *annectans* are 95 and 17 alleles, respectively.

3 The low number of 2N males detected in our samples does not mean that they
4 are not produced, but our results make evident that they are uncommon among adult
5 males collected through chemical baits. Analyses of *El. nigrita* (n = 8), *Eg. cordata* (n
6 = 11) and *Eg. townsendi* (n = 7) nests revealed no diploid males in 234 males found
7 inside these nests, and no differential mortality was observed in pupa or adult phases
8 between sexes (Souza *et al.* unpublished).

9 Diploid male production is a population property. In a random-mating species,
10 high diploid male production indicates small effective population size (Zayed *et al.*
11 2004), and it would not be warranted to assume that all populations of a certain
12 species will have similarly small sizes and similar DMP levels. For example, *El.*
13 *meriana* and *Eg. imperialis* samples from Panama showed high frequency of males
14 that are diploid (Roubik *et al.* 1996), but none was observed in our Brazilian samples.

15 Mark and recapture data showed some euglossine bees have long-distance
16 dispersal abilities, being able to return to their nest from distances ranging from 14 to
17 23 kilometres as observed in *Euplusia (Eufriesea) surinamensis* (Janzen 1971).
18 Phylogeographical data (Dick *et al.* 2004) also support the view that euglossine bees
19 have long-distance dispersion capacity, being this an important feature for population
20 maintenance of euglossine bees, because it may function as a mechanism to avoid
21 inbreeding.

22 Although DMP is a population parameter, some species could be more
23 vulnerable to this condition. Species differ in their susceptibility to isolation by habitat
24 fragmentation, since euglossine bee species appear to have differences in their flight
25 capacities over open areas. Moreover, a high seasonal and limited distribution make

1 some species more susceptible to environmental changes and habitat fragmentation.
2 According to Packer *et al.* (2005), the more specific the needs of a species, the greater
3 the impact on its survivor.

4 Euglossine bees are on the main focus about deforestation and loss of habitat
5 due to the strong mutualistic relationships between their males and orchid flowers.
6 Diploid male occurrence in euglossine bees as an indicative of pollinator decreases
7 and as diagnostic toll for environmental conservation was recently proposed by Zayed
8 *et al.* (2004). These authors considered that even in areas relatively preserved with
9 over 10,000 ha, populations are feeling the impacts of resource decreases. However,
10 we detected only one diploid male in areas neighbouring São Carlos city where 95%
11 of the original vegetation has been substituted by a sugar-cane monoculture (Soares *et*
12 *al.* 2003).

13 Diploid male production is still an open question, and certainly a special
14 attention must be given for those species which suffer with environment alteration.
15 Diploid male production must not be a general condition for euglossine bee
16 populations, but the result of a particular combination of biological (dispersion
17 pattern, foraging and mating behaviour) and demographical (population size and
18 distribution) of each species, added to the effect of the reduction of habitat and
19 connectivity among available fragments over them. Knowledge of the factors that
20 could explain the drastic differences on DMP among Panamanian and Colombian vs.
21 Brazilian populations will be crucial to propose effective bee conservation programs
22 in order to minimize the decline of these important pollinators.

23

24

25

1 ACKNOWLEDGMENTS

2 We thank JC Serrano and EJ dos Anjos Silva for species identification; MM López-
3 Uribe and CA Oi for help in sampling; EMBRAPA Pecuária Sudeste, Parque
4 Ecológico de São Carlos and Canil Municipal de São Carlos for permission to sample
5 bees in their areas. Our special thanks go to IBAMA (Dr. Helena K. Boscolo) for the
6 licence to collect and transport the material; to the members of Universidade Federal
7 de São Carlos and Queen's University Belfast for all support, and CNPq (Edital
8 Universal 475935/04-7), CNPq (n° 142131/03-2) and CAPES (BEX- 218204/1) for a
9 scholarship to ROS.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **REFERENCES**

- 2 AYABE, T., HOSHIBA, H. and ONO, M. 2004. Cytological evidence for triploid
3 males and females in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Chromosome Research*, 12:
4 215-223.
- 5 COOK, J. M. 1993. Sex determination in the Hymenoptera. A review of models and
6 evidence. *Heredity*, 71, 421-435.
- 7 COOK, J. M. and CROZIER, R. H. 1995. Sex determination and population biology
8 in the Hymenoptera. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 281-286.
- 9 COWAN, D. P. and STAHLHUT, J. K. 2004. Functionally reproductive diploid and
10 haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination.
11 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,
12 101, 10374-10379.
- 13 CUNHA, A. B. and KEER, W. E. 1957. A genetical theory to explain sex
14 determination by arrhenotokous parthenogenesis. *Forma et Functio*, 1, 33-36.
- 15 DICK, C.W., ROUBIK, D.W., GRUBER, K.F. and BERMINGHAM, E. 2004. Long-
16 distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae :
17 Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular*
18 *Ecology*, 13 3775-3785.
- 19 DOBSON, S. L. and TANOUYE, M. A. 1998. Evidence for a genomic imprinting sex
20 determination mechanism in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera; Chalcidoidea).
21 *Genetics*, 149, 233-242.
- 22 ELAGOZE, M., DREZEN, J. M., RENAULT, S., and PERIQUET, G. 1994. Analysis
23 of the reproductive potential of diploid males in the wasp *Diadromus pulchellus*
24 (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Bulletin of Entomological Research*, 84, 213-218.
- 25 ELTZ, T. and LUNAU, K. 2005. Antennal response to fragrance compounds in male
26 orchid bees. *Chemoecology*, 15, 135-138.
- 27 GOUDET, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-
28 statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- 29 HOSHIBA, H., OKADA, I. and KUSANAGI, A. 1981. The diploid drone of *Apis*
30 *cerana japonica* and its chromosomes. *Journal of Apicultural Research*, 20, 143-147.
- 31 JANZEN, D. H. 1971. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants.
32 *Science*, 171, 203-205.
- 33 LIEBERT, A.E., SUMANA, A. and STARKS, P.T. 2005. Diploid males and their
34 triploid offspring in the paper wasp *Polistes dominulus*. *Biology Letters*, 1, 200-203.
- 35 LÓPEZ-URIBE, M. M. 2006. Dinâmica e estrutura genética das populações de
36 abelhas Euglossini (Hymenoptera: Apidae) visitantes florais de *Thevetia peruviana*

- 1 (Apocynaceae) em áreas urbanas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de
2 São Carlos, São Carlos, SP, Brazil, pp 83.
- 3 LÓPEZ-URIBE, M. M., ALMANZA, M. T. and MARINA ORDOÑEZ, M. 2007.
4 Diploid male frequencies in Colombian populations of euglossine bees. *Biotropica*.
5 (OnlineEarly Articles).doi:10.1111/j.1744-7429.2007.00287.x
6
- 7 OWEN, R. E. and PACKER, L. 1994. Estimation of the proportion of diploid males
8 in populations of Hymenoptera. *Heredity*, 72, 219-227.
- 9 PACKER, L., ZAYED, A., GRIXTI, J. C., RUZ, L., OWEN, R. E., VIVALLO, F.
10 and TORO, H. 2005. Conservation genetics of potentially endangered mutualisms:
11 Reduced levels of genetic variation in specialist versus generalist bees. *Conservation*
12 *Biology*, 19, 195-202.
- 13 PAXTON, R. J., THOREN, P. A., TENGO, J., ESTOUP, A. and PAMILO, P. 1996.
14 Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii*
15 (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. *Molecular Ecology*, 5, 511-519.
- 16 RAYMOND, M. and ROUSSET, F. 1995. Genepop (Version-1.2) - Population-
17 Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-
18 249.
- 19 ROUBIK, D.W. 2001. Searching for genetic pattern in orchid bees: a reply to
20 Takahashi *et al.* *Evolution*, 55: 1900-1901.
21
- 22 ROUBIK, D. W., WEIGT, L. A. and BONILLA, M. A. 1996. Population genetics,
23 diploid males, and limits to social evolution of euglossine bees. *Evolution*, 50, 931-
24 935.
- 25 ROUBIK, D. W. and HANSON, P. E. 2004. Orchid Bees of Tropical America:
26 Biology and Field Guide. INBio Press, *Heredia*, Costa Rica. 370 pp.
27
- 28 SNELL, G. D. 1935. The determination of sex in *Habrobracon*. *Proceedings of the*
29 *National Academy of Sciences of the United States of America*, 446-453.
- 30 SOARES, J. J., SILVA, D. W. and LIMA, M. I. S. 2003. Current state and projection
31 of the probable original vegetation of the São Carlos region of São Paulo state, Brazil.
32 *Brazilian Journal of Biology*, 63, 527-536.
- 33 SOUZA, R.O., CERVINI, M., DEL LAMA, M.A. and PAXTON, R.J. 2007.
34 Microsatellite loci for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Molecular*
35 *EcologyNotes*. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01878.x
36
- 37 STOUTHAMER, R., LUCK, R. F. and WERREN, J. H. 1992. Genetics of sex
38 determination and the improvement of biological-control using parasitoids.
39 *Environmental Entomology*, 21, 427-435.

- 1 TAKAHASHI, N. C., PERUQUETTI, R. C., DEL LAMA, M. A. and CAMPOS, L.
2 A. 2001. A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera:
3 Apidae). *Evolution*, 55, 1897-1899.
- 4 TALLMON, D.A., LUIKART, G. and BEAUMONT, M.A. 2004. Comparative
5 evaluation of a new effective population size estimator based on approximate
6 Bayesian computation. *Genetics*, 167, 977-988.
- 7 TONHASCA, A., ALBUQUERQUE, G. S. and BLACKMER, J. L. 2003. Dispersal
8 of euglossine bees between fragments of the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of*
9 *Tropical Ecology*, 19, 99-102.
- 10 TSUCHIDA, K., NAGATA, N. and KOJIMA, J. 2002. Diploid males and sex
11 determination in a paper wasp, *Polistes chinensis antennalis* (Hymenoptera,
12 Vespidae). *Insectes Sociaux*, 49, 120-124.
13
- 14 VAN WILGENBURG, E., DRIESSEN, G. and BEUKEBOOM, L. W. 2006. Single
15 locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design?
16 *Frontiers in Zoology*, Published online 2006.
17
- 18 WHITING, P. W. 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of
19 *Habrobracon*. *Genetics*, 28, 365-382.
- 20 WOYKE, J. 1979. Sex determination in *Apis cerana indica*. *Journal of Apicultural*
21 *Research*, 18, 122-127.
- 22 ZAYED, A. 2004. Effective population size in Hymenoptera with complementary sex
23 determination. *Heredity*, 93, 627-630.
- 24 ZAYED, A. and PACKER, L. 2001. High levels of diploid male production in a
25 primitively eusocial bee (Hymenoptera : Halictidae). *Heredity*, 87, 631-636.
- 26 ZAYED, A. and PACKER, L. 2005. Complementary sex determination substantially
27 increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the*
28 *National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10742-10746.
- 29 ZAYED, A., ROUBIK, D. W. and PACKER, L. 2004. Use of diploid male frequency
30 data as an indicator of pollinator decline. *Proceedings of The Royal Society of London*
31 *Series B-Biological Sciences*, 271, S9-S12.
32

Table 1. Microsatellite loci developed for *Euglossa cordata* and *Eulaema nigrita* (Souza *et al.* 2007) used to analyse euglossine bee species and marker variability (expected intralocus heterozygosity).

Species	Expected intralocus heterozygosity (males only)										N pol. loci
	N	Egc 17	Egc 18	Egc 24	Egc 26	Egc 30a	Egc 30b	Egc 35	Egc 37	Egc 51	
<i>Euglossa annectans</i>	17m	+	#	#	0	0		+	+	+	6
		0.80	0.65	0.65			-	0.23	0.62	0.32	
<i>Eg. chalybeata</i>	19m	+	+	0	+	0		+	+	+	6
		0.56	0.72		0.39		-	0.38	0.72	0.56	
<i>Eg. cognata</i>	1m										
<i>Eg. cordata</i>	67m	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
	66f	0.87	0.88	0.70	0.83	0.56	0.94	0.58	0.91	0.47	
<i>Eg. fimbriata</i>	7m	+	+	+	+		+	+	+	+	8
		0.69	0.78	0.61	0.61	-	0.86	0.25	0.24	0.25	
<i>Eg. imperialis</i>	30m	+	+	0	+			+	+	+	6
		0.75	0.81		0.46	-	-	0.74	0.77	0.50	
<i>E. intersecta</i>	1m										
<i>Eg. mandibularis</i>	95m	+	+	#	0				+	0	4
		0.86	0.66	0.67		-	-	-	0.77		
<i>Eg. melanotricha</i>	8m	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
		0.81	0.78	0.78	0.41	0.63	0.88	0.32	0.78	0.57	
<i>Eg. moure</i>	1m										
<i>Eg. mixta</i>	3m	+	0	0	0	+	+	+	+	0	5
		0.44				0.44	0.67	0.44	0.44		
<i>Eg. pleosticta</i>	4m	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9
		0.63	0.63	0.38	0.63	0.63	0.75	0.63	0.75	0.63	

<i>Eg. securigera</i>	8m	+	+	+	+	+	+	+	+	+			9
		0.66	0.63	0.59	0.38	0.67	0.86	0.22	0.75	0.47			
<i>Eg. townsendi</i>	4m	+	+	+	+	+	0	+	+	+			8
	2f	0.63	0.75	0.50	0.63			0.38	0.63	0.63			
<i>Eg. truncata</i>	10m	+	+	+	+		+	+	+	+			8
		0.78	0.74	0.58	0.76	-		0.42	0.78	0.34			
<i>Eg. viridis</i>	1m												
<i>Eufriesea violacea</i>	53m	+	+						0	+			3
		0.85	0.83	-	-	-	-	-		0.29			
<i>Exaerete frontalis</i>	8m	+	0						0				1
		0.83		-	-	-	-	-		-			
<i>Ex. smaragdina</i>	51m	+	0						0	0			1
	3f	0.83		-	-	-	-	-					
Species	N	Eln 1	Eln 12a	Eln 12b	Eln 13	Eln 2J	Eln 5J	Eln 7J	Eln 10J	Eln 12J	Eln 18J	Eln 19J	
<i>Eg. mandibularis</i>	95m		0	+	+			0			+	#	4
		-		0.15	0.52	-	-		-	-	0.60	0.89	
<i>Eulaema bombiformis</i>	21m	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11
		0.67	0.88	0.72	0.68	0.88	0.89	0.90	0.91	0.67	0.93	0.90	
<i>El. cingulata</i>	8m	+	+	+	0	+	+		+	0	0	+	7
		0.81	0.75	0.66		0.69	0.47	-	0.53			0.47	
<i>El. meriana</i>	26m	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
			0.74	0.74	0.27	0.75	0.50	0.80	0.67	0.78	0.90	0.79	
<i>El. nigrita</i>	40m	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11
	22f	0.81	0.83	0.67	0.85	0.82	0.86	0.85	0.82	0.78	0.62	0.90	
<i>Eufriesea violacea</i>	53m		+	+	0	+		+	+	+	+	+	8
		-	0.65	0.50		0.48	-	0.56	0.68	0.56	0.42	0.37	
<i>Exaerete frontalis</i>	8m			+	0	0	0					+	2
		-	-	0.65				-	-	-	-	0.78	
<i>Ex. smaragdina</i>	51m			+	0	0	0	0				+	2
	3f	-	-	0.81					-	-	-	0.79	

0 = monomorphic; + = polymorphic; # = one 2N male detected; - no PCR product

Table 2. Species name, collection sites, number of males sampled (n), range of expected intralocus heterozygosity (Hi), expected mean heterozygosity (H_{exp}), probability of detecting a heterozygous male if diploid (P_{het}), observed number of 2N males and expected maximum frequency of 2N males (for n ≥ 19) in samples of euglossine bees.

Species name	Collection Site	n	Hi	H _{exp}	P _{het}	2N males	2N males Max
<i>Euglossa annectans</i>	São Carlos - SP (Br)	17 *	0.23 – 0.80	0.41	0.995	1*	
<i>Eg. chalybeata</i>	Manaus - AM (Br)	19	0.28 – 0.77	0.45	0.998	0	0.05
<i>Eg. cognata</i>	Villavicencio - (Co)	1				0	
<i>Eg. cordata</i>	Caraguatatuba - SP (Br)	37 *	0.47 – 0.94	0.75	0.999	0	0.01
	São Carlos - SP (Br)	30 *					
<i>Eg. fimbriata</i>	São Carlos - SP (Br)	7 *	0.25 – 0.86	0.56	0.999	0	
<i>Eg. imperialis</i>	Manaus - AM (Br)	30	0.46 – 0.81	0.58	0.999	0	0.03
<i>Eg. intersecta</i>	Manaus - AM (Br)	1				0	
<i>Eg. mandibularis</i>	Viçosa - MG (Br)	95 * ^a	0.15 – 0.89	0.43	0.999	1*	
<i>Eg. melanotricha</i>	Analândia - SP (Br)	8 *	0.32 – 0.88	0.66	0.999	0	
<i>Eg. mixta</i>	Villavicencio - (Co)	3	0.44 – 0.67	0.27	0.942	0	
<i>Eg. moure</i>	Manaus - AM (Br)	1				0	
<i>Eg. pleosticta</i>	São Carlos - SP (Br)	4 *	0.38 – 0.75	0.63	0.999	0	
	Camburí - SP (Br)	2					
<i>Eg. securigera</i>	Rifaina - SP (Br)	3	0.22 – 0.86	0.60	0.999	0	
	São Carlos - SP (Br)	3 *					
<i>Eg. townsendi</i>	Araras - SP (Br)	3	0.28 – 0.78	0.56	0.999	0	
	Rifaina - SP (Br)	1					
<i>Eg. truncata</i>	São Carlos - SP (Br)	10 *	0.34 – 0.78	0.49	0.999	0	
<i>Eg. viridis</i>	Villavicencio - (Co)	1				0	
<i>Eulaema bombiformis</i>	Manaus - AM (Br)	21	0.67 – 0.93	0.82	0.999	0	0.05
<i>El. cingulata</i>	Manaus - AM (Br)	8	0.47 – 0.81	0.44	0.999	0	
<i>El. meriana</i>	Manaus - AM (Br)	26	0.27 – 0.90	0.63	0.999	0	0.04
	Cuiabá - MT (Br)	4					
	Manaus - AM (Br)	4					
	Marliéria - MG (Br)	5					
	Mimoso - MG (Br)	4					
<i>El. nigrita</i>	Poconé - MT (Br)	3 *	0.61 – 0.91	0.80	0.999	0	0.03
	Rifaina - SP (Br)	5					
	S. J. Campos - SP (Br)	5					
	São Carlos - SP (Br)	5 *					
	Viçosa - MG (Br)	5					
<i>Eufriesea violacea</i>	São Carlos - SP (Br)	17	0.29 – 0.85	0.48	0.999	0	0.02
	Viçosa - MG (Br)	36					
<i>Exaerete frontalis</i>	João Pessoa - PB (Br)	8	0.65 – 0.78	0.28	0.983	0	
<i>Ex. smaragdina</i>	João Pessoa - PB (Br)	50	0.79 – 0.83	0.24	0.993	0	0.02
	São Carlos - SP (Br)	1					
TOTAL		483	0.15 – 0.94	0.53	0.995	2*	

* same samples as analyzed by Takahashi *et al.* (2001);

^a n = 76 new samples added in addition to those of Takahashi *et al.* (2001)

1 **Determinação da estrutura sociogenética de ninhos de Euglossini com o uso de**
2 **DNA microssatélite.**

3

4 Souza, R.O.*, Mortari, N. #, Paxton, R.J.‡ and Del Lama, M.A.*

5

6 * Laboratório de Genética Evolutiva de Himenópteros and # Laboratório de
7 Imunogenética - DNA, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal
8 de São Carlos, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

9

10 ‡ School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, 97 Lisburn Road, Belfast
11 BT9 7BL, UK.

12

13 **Palavras-chave:** estrutura sociogenética nidal, Abelhas Euglossini, locos
14 microssatélites,

15

16 **Autor para correspondência:** Rogério O. Souza, Laboratório de Genética Evolutiva
17 de Himenópteros, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de
18 São Carlos, CEP 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

19

20 Email: pros@iris.ufscar.br

21

22 Fax: (55) 16 3351-8377

1 **Resumo**

2 Indivíduos emergidos de ninhos de *Eulaema nigrita* (n = 8), *Euglossa cordata* (n =
3 11) e *Euglossa townsendi* (n = 7), coletados nas cidades de Araras, Rifaina e São
4 Carlos, tiveram seu DNA total extraído e foram analisados para locos microssatélites
5 para determinação da estrutura sociogenética nidal. Os resultados revelaram que os
6 ninhos de *El. nigrita* são inicialmente formados por uma única fêmea e,
7 posteriormente, compartilhados por fêmeas não aparentadas. Diferentemente, os
8 ninhos de *Eg. cordata* e *Eg. townsendi* foram, em geral, formados por uma única
9 fêmea, aparentemente acasalada com um só macho, embora na segunda espécie
10 também tenha sido observado o compartilhamento do ninho por fêmeas não
11 aparentadas em um dos sete ninhos estudados.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 INTRODUÇÃO

2 As euglossíneas ou abelhas das orquídeas fazem parte do grupo de abelhas
3 corbiculadas, sendo algumas popularmente conhecidas como mamangavas.
4 Apresentam distribuição tipicamente neotropical (Búrquez 1997) e uma gama de
5 comportamentos que varia do solitário ao primitivamente social. O hábito dos machos
6 de coletar fragrâncias em flores de orquídeas foi inicialmente observado por
7 orquidologistas. Estes compostos foram posteriormente isolados e utilizados para
8 capturar machos possibilitando a descrição de novas espécies, além de permitir o
9 estudo de fatores como sazonalidade e preferência destes pelas fragrâncias, genética
10 de populações e ocorrência de machos diplóides, estimativas de tamanho populacional
11 em experimentos de marcação e recaptura, entre outros temas (Dressler 1968; Dodson
12 *et al.* 1969; Braga 1976; Janzen 1981a; Janzen 1981b; Folsom 1985; Powell & Powell
13 1987; Roubik & Ackerman 1987; Campos *et al.* 1989; Ackerman 1989; Wittmann *et*
14 *al.* 1989). Embora o conhecimento da biologia dos machos tenha avançado de forma
15 significativa, estudos envolvendo o comportamento de fêmeas são mais esparsos.

16 Sendo um grupo onde também estão presentes estágios intermediários no que
17 se refere à evolução do comportamento social, este pode fornecer informações
18 relevantes para a compreensão dos mecanismos que atuam no estabelecimento de
19 sistemas sociais. Os ninhos neste grupo são comumente construídos em cavidades de
20 árvores ou galhos, paredes de construções, segmentos de bambu, ninhos de cupins,
21 folhas fixas, e uma gama de outros ambientes. Embora estejam descritas mais de 200
22 espécies de Euglossini, somente para 38 delas se conhece a estrutura dos ninhos
23 (Ramírez *et al.* 2002).

24 Estudos com ninhos armadilhas e ninhos naturais mantidos em caixas de
25 observação promoveram de maneira bastante expressiva o entendimento das relações

1 entre os indivíduos ocupantes de um mesmo ninho (Sakagami & Michener 1965;
2 Myers & Loveless 1976; Garófalo 1992; Santos & Garófalo 1994; Arriaga *et al.*
3 1996). Escolhido o local, a fêmea dá início à coleta de material utilizado na
4 construção das células, seja barro, excrementos ou resinas. Após construir uma célula
5 e tendo provisionado-a com alimento, geralmente uma mistura de pólen e néctar, ela
6 deposita o ovo. Em alguns casos, pode ocorrer o compartilhamento do ninho por mais
7 de uma fêmea durante processos de reativação destes (Garófalo 1985; Augusto &
8 Garófalo 2004).

9 O objetivo deste estudo foi averiguar a estrutura sociogenética dos ninhos de
10 *Eulaema nigrata* (Lepeletier, 1841), *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758) e *Euglossa*
11 *townsendi* (Cocherell, 1904). Especial atenção foi dada ao parentesco intranidal, de
12 forma a estimar, por meio de locos microssatélites, o número de fêmeas e machos
13 responsáveis pela cria. Além disso, as relações entre o comportamento social e de
14 nidificação foram contrapostos aos padrões genéticos observados.

15

16 MATERIAL E MÉTODOS

17 Foram coletados 8 ninhos (N1 - N8) de *El. nigrata* na área do Campus da
18 Universidade Federal de São Carlos, construídos no interior de blocos de concreto
19 (Figura 1). Onze ninhos de *Eg. cordata* (9 em secções de bambu, 1 em tronco de
20 eucalipto e um em galho de *Bougainville* sp.) e 7 ninhos de *Eg. townsendi* (todos
21 fundados em secções de bambu), foram coletados na área urbana da cidade de São
22 Carlos e área rural de Rifaina, e nos Campi da UFSCar de Araras e São Carlos, sendo
23 mantidos no laboratório à temperatura ambiente até a emergência das crias. As
24 secções de bambu utilizadas apresentavam comprimento e diâmetro variáveis (Figura
25 2), e os ninhos construídos em tronco de eucalipto e no galho de *Bougainville* sp

1 haviam sido anteriormente ocupados por *Xylocopa* sp. como locais de nidificação
2 (Figura 3). Ao emergirem, os adultos foram sexados, pesados e congelados à -20°C
3 ou mantidos em álcool absoluto. Após a última emergência natural em cada ninho,
4 aguardou-se um prazo mínimo de dois meses; decorrido este período, as células
5 fechadas foram abertas com utilização de pinça para verificação do conteúdo.

6 DNA total foi extraído a partir de uma das pernas desses indivíduos utilizando
7 ou extração salina / álcool para indivíduos de emergência natural (Paxton *et al.* 1996)
8 ou extração por Chelex 100 (Walsh *et al.* 1991) para indivíduos mortos. Amplificação
9 por PCR de locos microssatélites foi realizada utilizando-se primers de *El. nigrita* e
10 *Eg. cordata* marcados com fluorescência (Souza *et al.*, 2007). Os fragmentos gerados
11 foram analisados em seqüenciador MegaBACE – 750 (GE - Applied BioSystems) de
12 acordo com o padrão de picos gerado para cada loco.

13

14 RESULTADOS

15 Biologia de Nidificação

16 A entrada dos ninhos de *El. nigrita* apresentou cerca de 1,5 cm de diâmetro,
17 sendo revestida de barro, formando um pequeno tubo que se iniciava no interior dos
18 blocos de construção, prolongando-se por cerca de 2,0cm para o exterior, não
19 excedendo 5,0 cm de comprimento total. O número de células produzidas por ninho
20 de *El. nigrita* variou de 1 a 90 (Tabela 1). Nos ninhos onde o número de células
21 formadas foi muito baixo (N6 e N8), a morte ou o abandono do ninho pela(s) fêmea(s)
22 deve ser a causa mais provável, pois nestes ninhos foi observada uma célula apical
23 aberta.

1 Em dois desses blocos contendo ninhos de *El. nigrita* foram coletadas fêmeas
2 mortas em seu interior (antes da operculação das células). As análises revelaram que
3 estas eram as prováveis responsáveis por parte da postura.

4 A mortalidade total foi de 65, 19, 22 e 20% nos ninhos N2, N3, N4 e N5,
5 respectivamente. A alta taxa de mortalidade, em especial para o ninho N2, deveu-se à
6 entrada de água no interior do bloco, visto que apresentava uma grande rachadura. A
7 Tabela 1 mostra que não foi observada mortalidade diferencial entre os sexos ($p < 5\%$)
8 . Os níveis de mortalidade em adultos não eclodidos foi de 24, 13, 9 e 9% (ninhas N2,
9 N3, N4 e N5, respectivamente), de 3% na fase de larva (N4), 2% em fase de pupa
10 (N5), e a fração restante da mortalidade foi observada em estágio de ovo.

11 Nos ninhos N1, N2 e N3 observou-se a presença da espécie cleptoparasita
12 *Exaerete smaragdina* (Guérin-Méneville, 1845), estando esses indivíduos presentes
13 nas células mais basais do ninho.

14 Em dois ninhos (N2 e N3) foi observada ainda a presença de *Lasioderme* sp.
15 (Coleoptera: Amobiidae) em algumas células. Este pequeno coleóptero (2 a 3 mm) é
16 um consumidor de matéria orgânica, sendo um dos principais problemas para os
17 apreciadores de charutos. Não foi observado, contudo, qualquer dano causado a *El.*
18 *nigrita*.

19 O início da construção dos ninhos de *Eg. cordata* e *Eg. townsendi* foi
20 verificado pela observação da atividade das fêmeas ingressando nos ninhos ou pela
21 presença de resina no interior destes. O término das atividades de campo (fêmeas) foi
22 estimado pela construção da parede de fechamento sem que houvesse ruptura desta
23 por alguns dias, o que poderia indicar que a fêmea trabalhava em seu interior ou
24 também abandono/morte da fêmea que construía o ninho.

1 O número de células construídas por ninho e de indivíduos que emergiram
2 variou de 1 a 14 para os onze 11 ninhos de *Eg. cordata* e de 1 a 32 emergidos em *Eg.*
3 *townsendi*. Nesta última espécie, um dos ninhos (32 crias) tinha 77 células, ou seja,
4 mais da metade da postura ali feita já havia emergido quando o ninho foi coletado. A
5 taxa de mortalidade não foi significativamente diferente entre os sexos nestas
6 espécies, e a mortalidade nas fases de ovo ou larva foi estimada somente em *Eg.*
7 *cordata* (Tabela 2). Foi observada uma razão sexual de 35 fêmeas: 26 machos (1:1) e
8 39 fêmeas: 19 machos (2:1) em *Eg. cordata* e *Eg. townsendi*, respectivamente. A
9 mortalidade foi de 1 fêmea, 1 larva e quatro ovos, e 4 fêmeas e 3 machos para *Eg.*
10 *cordata* e *Eg. townsendi*, respectivamente no total de ninhos (Tabela 2).

11 Reaproveitamento de ninho foi evidenciado no ninho do qual emergiram os 32
12 indivíduos referidos anteriormente. O reaproveitamento foi inferido a partir da
13 diferença de coloração da resina utilizada e do estado das células. Nos demais ninhos,
14 por se tratarem de bambus e tocos dispostos mais recentemente, não houve indícios de
15 reaproveitamento de células.

16

17 Genética Intranidal

18 A análise dos ninhos utilizando marcadores microssatélites revelou a presença
19 de mais de uma fêmea ovipositando nos ninhos de *Eg. nigrita*, com exceção de N8
20 (com apenas duas células), cuja análise revelou se tratar de postura de uma única
21 fêmea acasalada aparentemente com um só macho.

22 Considerando o número de alelos e os haplótipos observados nos ninhos, a
23 análise de cada progênie evidenciou a presença de, pelo menos, 3 (N1), 2 (N2), 8
24 (N3), 6 (N4) e 7 (N5) fêmeas responsáveis pela postura. Esses números foram
25 estimados com base nos alelos presentes nos machos em cada um dos locos. Para

1 exemplificar, se em um determinado ninho 15 alelos de um certo loco foram
2 observados nos machos, como estes são produzidos pelas fêmeas e estas podem ter,
3 no máximo, dois alelos distintos por loco, tem-se que seriam necessárias pelo menos 8
4 fêmeas para justificar tal resultado.

5 Com relação aos indivíduos de *Ex. smaragdina* nascidos dos ninhos N2 e N3,
6 estes foram também analisados através dos marcadores microssatélites e os resultados
7 revelaram que estas fêmeas eram provavelmente irmãs completas.

8 Para os ninhos de *Eg. cordata* e *Eg. townsendi*, a análise genética revelou que
9 a prole deve ser resultante do acasalamento único (monândrico) de uma única fêmea
10 em 15 dos 18 ninhos analisados. Em um ninho de *Eg. cordata* e outro de *Eg.*
11 *townsendi*, não foi possível atribuir a maternidade à fêmea que ocupava o ninho no
12 momento da coleta, e nestes dois ninhos, o número de células formadas foi igual a
13 dois.

14 Em relação ao ninho de *Eg. townsendi* contendo 77 células, a disposição
15 destas no bambu era em pequenos grupos de células, levemente distantes uns dos
16 outros e não de forma contínua. Os marcadores microssatélites indicaram uma
17 tendência de fêmeas diferentes ovipositando cada um destes grupos de células;
18 contudo, a dificuldade em delimitá-los e de identificar a origem de cada um dos
19 indivíduos emergidos não nos possibilitou afirmações mais conclusivas. O número
20 mínimo de fêmeas responsáveis pela postura dos 32 adultos emergidos foi igual a 3,
21 segundo o número de alelos observados nos machos.

22

23

24

25

1 DISCUSSÃO

2 Os resultados sobre a biologia de nidificação (arquitetura dos ninhos) aqui
3 reportados são semelhantes aos descritos por Garófalo (1994) relativos à nidificação
4 em *El. nigrita*.

5 Não foi observada uma causa aparente (exceto água no bloco onde foi
6 encontrado o ninho N2) que pudesse justificar a alta mortalidade em *El. nigrita* no
7 estágio de ovo, ainda que, em muitos tenham sido encontrados fungos no interior
8 destas células. Embora os ovos não tenham sido diretamente observados, é de se supor
9 que a postura tenha sido realizada em células aprovisionadas e fechadas. Uma maior
10 mortalidade foi observada também na fase de ovo por Santos & Garófalo (1994).

11 A presença de *Ex. smaragdina* nas primeiras células construídas nos ninhos
12 N1, N2 e N3 indica que as fêmeas dessa espécie cleptoparasita aproveitam os
13 momentos iniciais da construção do ninho para estabelecer sua prole, evitando assim,
14 conflitos diretos com *El. nigrita*, as quais iniciam os ninhos de forma solitária, mas
15 podem posteriormente exibir um comportamento comunal (Pereira-Martins 1991).

16 Diferentemente, Garófalo & Rozen (2001) relataram ataques do parasita *Ex.*
17 *smaragdina* de uma forma contínua a ninhos de *El. nigrita*, estando presente posturas
18 tanto nas células mais basais como nas superiores. Esses autores observaram que as
19 fêmeas de *Ex. smaragdina* faziam vôos de aproximação de modo a sondar a presença
20 de fêmeas da espécie hospedeira. Caso não detectassem a presença de *El. nigrita*, elas
21 adentravam no ninho para realizar suas posturas; se porventura houvesse alguma
22 fêmea remanescente, rapidamente *Ex. smaragdina* deixava o ninho para evitar
23 confronto. O parasitismo ocorreu mesmo em ninhos onde até cinco fêmeas de *El.*
24 *nigrita* estavam presentes.

1 Embora em números absolutos não tenha ocorrido diferença no número de
2 parasitas nos ninhos N2 e N3 (dois parasitas cada), onde a postura foi feita por $n \geq 2$
3 fêmeas e por $n \geq 8$ fêmeas de *El. nigrita*, respectivamente, o parasitismo foi
4 relativamente menor em N3.

5 A maior defensividade do ninho contra predadores e parasitas é suposta como
6 mecanismo de pressão seletiva que pode ter resultado na mudança de um hábito
7 solitário para uma vida comunal. Essa maior defensividade não foi observada por
8 Santos & Garófalo (1994) envolvendo o besouro da espécie *Meloetyphlus fuscatus*,
9 um parasita de ninhos de *El. nigrita*. Esses autores consideraram que a estratégia do
10 besouro foi a de aumentar a postura de acordo com o maior número de fêmeas nos
11 ninhos e a reutilização destes.

12 Os ninhos de *El. nigrita* analisados parecem apresentar maior defensividade
13 com o aumento do número de fêmeas no ninho, e o aparente reaproveitamento em N5
14 (ninho mais antigo) não resultou em incremento na taxa de parasitismo.

15 O reaproveitamento de ninhos foi observado também em *Eg. cordata*
16 (Garófalo 1985) e *Eg. townsendi* (Augusto & Garófalo 2004), onde um dos aspectos
17 comuns nessas espécies foi a redistribuição das tarefas do ninho (postura e
18 forrageamento), sendo que, usualmente a fêmea fundadora desempenhava o papel de
19 dominante (ovipositora), e quando do desaparecimento da fundadora, tinha início a
20 disputa pelo papel de ovipositora, geralmente desempenhado pela fêmea mais antiga.

21

22

23

24

25

1 CONCLUSÕES

2 Os resultados da análise dos microssatélites corroboram os relatos da literatura
3 sobre o comportamento social destas espécies. *El. nigrita* é inicialmente solitária na
4 fundação de seus ninhos e, posteriormente, novas fêmeas podem se agregar. O
5 diferencial aqui observado é que o parentesco entre as fêmeas não parece ser fator
6 determinante para formação e manutenção a longo prazo dessa estrutura nidial (ninhos
7 novos – N3 e N4 vs. ninhos velhos – N5). Entretanto, são necessárias informações
8 sobre os demais comportamentos como usurpação de células, divisão de trabalho,
9 interações agonísticas entre as fêmeas dentro dos ninhos, para que se possa
10 compreender mais claramente, como esses comportamentos estão relacionados aos
11 níveis de parentesco observados nos ninhos e prováveis fatores que contribuem na
12 evolução do comportamento nesta espécie parassocial. O acasalamento único parece
13 ser a regra em *El. nigrita*, como observado mais facilmente nos ninhos pequenos,
14 embora um acompanhamento mais refinado, principalmente envolvendo grandes
15 posturas, deva ser feito para que tal questão seja totalmente esclarecida.

16 É interessante notar que em *Eg. cordata* e *Eg. townsendi*, o hábito solitário e a
17 monandria são eventos comuns. Contudo, parece que a segunda espécie se comporta
18 de forma mais flexível, assemelhando-se ao observado em *El. nigrita*, ou seja, fêmeas
19 não aparentadas podem compartilhar o ninho. As pressões e oportunidades de divisão
20 de ninho podem ter contribuído para estabelecimento dos sistemas sociais e os estudos
21 envolvendo esse grupo de grande variação comportamental, segundo classificação de
22 Wilson (1971) e Michener (1974), podem fornecer indícios importantes de como
23 esses sistemas foram formados.

24

25

1 REFÊRENCIAS

- 2
- 3 Ackerman, J. D. 1989. Geographic and seasonal variation in fragrance choices and
4 preferences of males euglossine bees. *Biotropica*, 21: 340-347.
- 5 Arriaga, E. R., J. I. Aguilar-Cuadriello and E. M. Hernández. 1996. Nest structure and
6 parasite of *Euglossa atrovoneta* Dressler (Apidae: Bombinae: Euglossini) at Unión
7 Juárez, Chiapas, México. *Journal of Kansas Entomological Society*, 69: 144-152.
- 8 Augusto, S. C. and C. A. Garófalo. 2004. Nesting biology and social structure of
9 *Euglossa (Euglossa) townsendi* Cockerell (Hymenoptera, Apidae, Euglossini).
10 *Insectes Sociaux*, 51: 400-409.
- 11 Braga, P. I. 1976. Atração de abelhas polinizadoras de Orchidaceae com auxílio de
12 iscas-odores na Campina, Campinara e Floreta Tropical Umida da região de Manaus.
13 *Ciência e Cultura*, 28: 767-773.
- 14 Búrquez, A. 1997. Distributional limits of euglossine and meliponine bees
15 (Hymenoptera: Apidae) in northwestern Mexico. *Pan-Pacific Entomologist*, 73: 137-
16 140.
- 17 Campos, L. A., F. A. Silveira, M. L. Oliveira, C. V. Abrantes, E. F. Morato and G. A.
18 Melo. 1989. Utilização de armadilhas para a captura de machos de Euglossini
19 (Hymenoptera, Apoidea). *Revista Brasileira de Zoologia*, 6: 621-626.
- 20 Dodson, C. H., R. L. Dressler, H. G. Hills, R. M. Adams and N. H. Williams. 1969.
21 Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science*, 164: 1243-1249.
- 22 Dressler, R. L. 1968. Pollination by euglossine bees. *Evolution*, 22: 202-210.
- 23 Folsom, J. P. 1985. Dos nuevas tecnicas para capturar y marcar abejas machos de la
24 tribu Euglossini (Hymenoptera: Apidae). *Actualidades Biológicas*, 14: 20-25.
- 25 Garófalo, C. A. 1994. Biologia de nidificação dos Euglossinae (Hymenoptera,
26 Apidae). *Anais do Encontro sobre Abelhas*, 1: 17-26.
- 27 Garófalo, C. A. 1985. Social structure of *Euglossa cordata* nests (Hymenoptera:
28 Apidae: Euglossini). *Entomologia Generalis*, 11: 77-83.
- 29 Garófalo, C. A. 1992. Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de
30 *Euglossa cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Revista Brasileira de Biologia*,
31 52: 187-198.
- 32 Garófalo, C. A. and JR. J. G. Rozen. 2001. Parasitic behavior of *Exaerete smaragdina*
33 with descriptions of its mature oocyte and larval instars (Hymenoptera: Apidae:
34 Euglossini). *American Museum Novitates*, 3349: 1-26.
- 35 Janzen, D. H. 1981a. Bee arrival at two Costa Rican female *Catasetum* orchid
36 inflorescences, and a hypothesis on euglossine population structure. *Oikos*, 36: 177-
37 183.

- 1 Janzen, D. H. 1981b. Reduction in euglossine bee species richness on Isla del Caño, a
2 Costa Rican offshore island. *Biotropica*, 13: 238-240.
- 3 Michener, C. D. 1974. *The social behaviour of the bees. A comparative study*. The
4 Belknap Press., Cambridge.
- 5 Myers, J. and M. D. Loveless. 1976. Nesting aggregations of the euglossine bee
6 *Euplusia surinamensis* (Hymenoptera: Apidae): individual interactions and the
7 advantage of living together. *The Canadian Entomologist*, 108: 1-6.
- 8 Paxton, R. J., P. A. Thoren, J. Tengo, A. Estoup and P. Pamilo. 1996. Mating
9 structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera,
10 Andrenidae), using microsatellites. *Molecular Ecology*, 5: 511-519.
- 11 Pereira-Martins, S. R. 1991. Biologia de *Eulaema nigrita*. 2. Atividades nidais. *Papéis*
12 *Avulsos de Zoologia*, 37: 237-243.
- 13 Powell, A. H. and G. V. Powell. 1987. Population dynamics of male euglossine bees
14 in Amazonian forest fragments. *Biotropica*, 19: 176-179.
- 15 Ramírez, S., R. L. Dressler and M. Ospina. 2002. Abejas euglosinas (Hymenoptera:
16 Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología.
17 *Biota Colombiana*, 3: 7-118.
- 18 Roubik, D. W. and J. D. Ackerman. 1987. Long-term ecology of euglossine orchid-
19 bees (Apidae: Euglossini) in Panama. *Oecologia (Berlin)*, 73: 321-333.
- 20 Sakagami, S. F. and C. D. Michener. 1965. Notes on the nest of two euglossine bees,
21 *Euplusia violacea* and *Eulaema cingulata* (Hymenoptera, Apidae). *Annotationes*
22 *Zoologicae Japonenses*, 38: 216-222.
- 23 Santos, M. L. and C. A. Garófalo. 1994. Nesting biology and nest re-use of *Eulaema*
24 *nigrita* (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). *Insectes Sociaux*, 41: 99-110.
25
- 26 Souza, R.O., Cervini, M., Del Lama, M.A. and Paxton, R.J. 2007. Microsatellite loci
27 for euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). *Molecular EcologyNotes*. doi:
28 10.1111/j.1471-8286.2007.01878.x
29
- 30 Walsh, P. S., D. A. Metzger and R. Higuchi. 1991. Chelex-100 as a medium for
31 simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material.
32 *Biotechniques*, 10: 506-513.
- 33 Wilson, E. O. 1971. *The insect societies*. The Belknap Press of Harvard University
34 Press, Cambridge.
- 35 Wittmann, D., R. Radtke, M. Hoffmann and B. Blochtein. 1989. Seasonality and
36 seasonal changes in preferences for scent baits in *Euplusia violacea* in Rio Grande do
37 Sul/Brasil (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Entomologia Generalis*, 14: 217-221.

1

2

Tabela 1. Razão sexual e taxa de emergência para oito ninhos de *Eulaema*

3

nigrita coletados no interior de blocos de construção no Campus da UFSCar em São

4

Carlos (SP).

5

6

Ninho	Espécie	Sexo	Mortos	Total
N1	<i>El. nigrita</i>	Macho		8
	<i>El. nigrita</i>	Fêmea		8
	<i>Ex. smaragdina</i>	Fêmea		1
N2	<i>El. nigrita</i>	Macho	3	7
	<i>El. nigrita</i>	Fêmea	1	3
	<i>Ex. smaragdina</i>	Fêmea	2	2
		Ovo	7	7
N3	<i>El. nigrita</i>	Macho	7	49
	<i>El. nigrita</i>	Fêmea	1	10
	<i>Ex. smaragdina</i>	Fêmea		2
		Ovo	4	4
N4	<i>El. nigrita</i>	Macho	6	55
	<i>El. nigrita</i>	Fêmea		7
	<i>El. nigrita</i>	Larva	2	2
		Ovo	7	7
N5	<i>El. nigrita</i>	Macho	6	69
	<i>El. nigrita</i>	Fêmea	2	9
	<i>El. nigrita</i>	Pupas	2	2
		Ovo	10	10
N6	<i>El. nigrita</i>	Abandonado		1
N7	<i>El. nigrita</i>	Não determinado		7
N8	<i>El. nigrita</i>	Fêmea		2

7

8

9

10

11

12

1 Tabela 2. Razão sexual e taxa de emergência para onze ninhos de *Eg. cordata*
 2 e sete ninhos de *Eg. townsendi* coletados em ninhos armadilhas e em ramo de
 3 *Bougainville* sp. nas cidades de Araras, Rifaina e São Carlos (SP).

4

Ninho	Espécie	Sexo	Mortos	Total
1288	<i>Eg. cordata</i>	Macho		7
*		Fêmea		2
T1	<i>Eg. cordata</i>	Macho		2
*		Fêmea		9
B2	<i>Eg. cordata</i>	Macho		5
*		Fêmea	1	9
RB1	<i>Eg. cordata</i>	Macho		3
		Fêmea		3
		Larva	1	1
		Ovo	1	1
RB2	<i>Eg. cordata</i>	Ovo	3	3
RB3	<i>Eg. cordata</i>	Fêmea		2
RB4	<i>Eg. cordata</i>	Macho		1
		Fêmea		1
RB5	<i>Eg. cordata</i>	Fêmea		1
1271	<i>Eg. cordata</i>	Fêmea		1
1570	<i>Eg. cordata</i>	Macho		3
*		Fêmea		5
DMP	<i>Eg. cordata</i>	Macho		3
*		Fêmea		2
849	<i>Eg. cordata</i>	Macho		2
*				
486	<i>Eg. townsendi</i>	Macho	1	2
		Fêmea	1	4
957	<i>Eg. townsendi</i>	Macho		1
*		Fêmea	2	4
B1	<i>Eg. townsendi</i>	Macho	2	8
		Fêmea	1	24
1253	<i>Eg. townsendi</i>	Macho		1
*		Fêmea		1
551	<i>Eg. townsendi</i>	Macho		4
*		Fêmea		1
935	<i>Eg. townsendi</i>	Macho		2
		Fêmea		4
919	<i>Eg. townsendi</i>	Macho		1
		Fêmea		1

5



1

2

3

4

Figura 1. Ninho de *Eulaema nigrita* observado no interior de um bloco de construção. As células foram feitas com a utilização de barro, excremento e resina.



5

6

7

8

Figura 2. Ninho de *Euglossa cordata* construído em secção de bambu. As células, feitas com resina, apresentam coloração bastante variável.



9

10

11

Figura 3. Entrada de um ninho de *Euglossa cordata* construído em um toco de *Eucalyptus* sp. anteriormente ocupado por *Xylocopa* sp.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os marcadores de DNA microssatélites desenvolvidos a partir de amostras de *Eg. cordata* e *El. nigrita* permitiram o estudo populacional em espécies de quatro dos cinco gêneros de Euglossini (*Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesea* e *Exaerete*), constituindo dessa forma, um novo conjunto de marcadores genéticos que permitirá a obtenção de valiosas informações sobre a estrutura genética das populações e ninhos deste grupo de abelhas. Estes novos achados, somados aos dados de comportamento, morfologia e fisiologia, permitirão um amplo conhecimento da biologia e evolução das abelhas euglossíneas.

Os dados aqui apresentados sobre a presença de machos diplóides nos abelhas euglossíneas reforçam a idéia de que esses machos não são comuns em populações de diferentes espécies coletadas em distintas regiões do Brasil, contrastando com as altas frequências descritas em outros estudos. A presença desses machos diplóides, usualmente estéreis, se deve à homozigose do loco sexual. O aumento da ocorrência desses machos (estéreis) reduz o número efetivo da população, o que leva à diminuição do número de alelos sexuais, tendo como resultante desse processo retroalimentado, a extinção da espécie.

A fragmentação ambiental é considerada o principal evento desencadeador desse processo, onde devido à perda da capacidade de uma dada área em fornecer suporte adequado, como alimento e locais para nidificação para uma população grande, são formadas subpopulações, cujo isolamento pode vir a promover acasalamentos endogâmicos, aumentando assim a frequência desses machos. O estudo ora realizado com populações provenientes de uma gama considerável de distintos ambientes (Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado e áreas urbanas) muitos dos quais, provenientes de áreas fragmentadas pela ação humana, não corrobora tal

proposição, mesmo nas espécies cleptoparasitas *Exaerete frontalis* e *Ex. smaragdina*.

A análise genética dos ninhos revelou um baixo parentesco entre as fêmeas responsáveis pela oviposição na espécie parassocial *El. nigrita*, permitindo concluir que um alto nível de parentesco não é fator crucial para o estabelecimento e funcionamento desses ninhos. Em *Eg. cordata* e *Eg. townsendi*, o comportamento solitário e a monogamia parecem ser pontos comuns entre estas espécies na formação dos ninhos; porém, na segunda espécie foi observada uma maior flexibilidade, pois o compartilhamento de ninho por fêmeas não aparentadas (irmãs completas) também foi observado.

A utilização de locos microssatélites nos estudos populacionais em Euglossini permitirá verificar, de forma mais acurada, mudanças nos níveis de variação das espécies ao longo de intervalos de tempo mais curtos, podendo fornecer pistas mais precisas de como e quanto a fragmentação ambiental tem afetado estas populações. Sua utilização complementarará ainda o conjunto de marcadores genéticos, fornecendo um número maior de variantes quando comparado às variantes alozímicas.

Ao submeter a nova análise a frequência na natureza de machos diplóides, os dados sustentam que a ocorrência destes não é um evento comum. Analisando em conjunto os dados deste trabalho e os de Takahashi *et al.* (2001), tem-se que dos 883 indivíduos analisados, no total de 26 espécies, pertencentes a quatro dos cinco gêneros da tribo, somente dois machos diplóides foram observados. É difícil justificar a existência de um ambiente ou fatores que, combinados, possam promover os índices de machos diplóides relatados nas populações do Panamá. Novas populações de Euglossini de diferentes procedências devem ser analisadas e, caso os altos índices sejam confirmados, faz-se necessário propor medidas que possam promover a manutenção de um ambiente propício à preservação e conservação dessas espécies.

O comportamento intranidal, fêmeas ovipositoras vs. forrageadoras, comportamentos agonísticos, cooperação entre fêmeas, monandria vs. poliandria e relações com a evolução do comportamento social, podem agora ser analisados sob a luz do parentesco intranidal, o que permitirá explorar melhor os modelos de evolução do comportamento vs. parentesco nas abelhas.

9. REFERÊNCIAS

ACKERMAN, J.D. Euglossine bee pollination of the orchid *Cochleanthes lipscombiae*: a food source mimic. **American Journal of Botany**, v. 70, p. 830-834. 1983.

AUGUSTO, S.C., GARÓFALO, C.A. Estrutura social em ninhos de *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Anais do Encontro sobre Abelhas**, v. 3, p. 255-1998.

AYABE, T., HOSHIBA, H., ONO, M. Cytological evidence for triploid males and females in the bumblebee, *Bombus terrestris*. **Chromosome Research**, v. 12, p. 215-223. 2004.

BENNETT, F.D. Notes on a nest of *Eulaema terminata* Smith (Hymenoptera, Apoidea) with a suggestion of the occurrence of a primitive social system. **Insectes Sociaux**, v. 12, p. 81-92. 1965.

BÚRQUEZ, A. Distributional limits of euglossine and meliponine bees (Hymenoptera: Apidae) in northwestern Mexico. **Pan-Pacific Entomologist**, v. 73, p. 137-140. 1997.

CAMERON, S.A. Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Entomology**, v. 49, p. 377-404. 2004.

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

CRANE, P.R., FRIIS, E.M., PEDERSEN, K.R. The Origin and Early Diversification of Angiosperms. **Nature**, v. 374, p. 27-33. 1995.

CRUZ-LANDIM, C.C., STORT, A.C., CRUZ, M.A., KITAJIMA, E.W. Orgão tibial dos machos de Euglossini. Estudo ao microscópio óptico e eletrônico. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 25, p. 323-341. 1965.

DEL LAMA, M.A., TAKAHASHI, N.C., CAMPOS, L.A.O. Estimativa da proporção de machos diplóides em Euglossini (Hymenoptera: Apidae). **In: Encontro sobre Abelhas Anais do Encontro sobre Abelhas**, v. 3, p. 151-157. 1998.

DIETZ, A. Honey bees. In: **Social Insects**. Academic Press, New York, p. 323-360. 1982.

DODSON, C.H., DRESSLER, R.L., HILLS, H.G., ADAMS, R.M., WILLIAMS, N.H. Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, v. 164, p. 1243-1249. 1969.

- DOS ANJOS-SILVA, E.J. **Fenologia das abelhas Euglossini Latreille (Hymenoptera: Apidae) e a variação sazonal e geográfica na escolha de preferências por iscas-odores no Parque Nacional da Chapada dos Guimarães e na Província Serrana de Mato Grosso, Brasil.** 104 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2006.
- DOS ANJOS-SILVA, E. J., CAMILLO, E., GARÓFALO, C.A. Occurrence of *Aglae caerulea* Lepeletier & Serville (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) in the Parque Nacional da Chapada dos Guimarães, Mato Grosso State, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 868-870, 2006.
- DOS ANJOS-SILVA, E.J., ENGEL, M.S. Andena, S.R. Phylogeny of the cleptoparasitic bee genus *Exaerete* (Hymenoptera: Apidae). **Apidologie**. No prelo.
- DRESSLER, R.L. Observations on orchids and euglossine bees in Panama and Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, v. 15, p. 143-183. 1968.
- EBERHARD, W.G. Group nesting in two species of *Euglossa* bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 61, p. 406-411. 1988.
- ELAGOZE, M., DREZEN, J.M., RENAULT, S., PERIQUET, G. Analysis of the Reproductive Potential of Diploid Males in the Wasp *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera, Ichneumonidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 84, p. 213-218. 1994.
- ELTZ, T., SCHMID, M., ROUBIK, D.W. Haploid karyotype of two species of orchid bees (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 70, p. 142-144. 1997.
- ELTZ, T., LUNAU, K. Antennal response to fragrance compounds in male orchid bees. **Chemoecology**, v. 15, p. 135-138. 2005.
- ELTZ, T., AYASSE, M., LUNAU, K. Species-specific antennal responses to tibial fragrances by male orchid bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 71-79. 2006.
- ENGEL, M.S. Fossils and phylogeny: a paleontological perspective on social bee evolution. **Anais do IV Encontro sobre Abelhas**, p. 217-224. 2000.
- ENGEL, M.S. Family-group names for bees (Hymenoptera : Apoidea). **American Museum Novitates**, p. 1-33. 2005.
- ESKAFI, F.M., LEGNER, E.F. Parthenogenetic reproduction in *Hexacola* sp. Near *websteri*,

a parasite of *Hippelates* eye gnats. **Annals of The Entomological Society of America**, v. 67, p. 767-768. 1974.

ESTOUP, A., SOLIGNAC, M., HARRY, M., CORNUET, J.M. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in 2 insect species - *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 1427-1431. 1993.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S. Os Insetos e o Reino Animal. In: **Entomologia Agrícola**. FEALQ p. 96-106. 2002

GARÓFALO, C.A. Comportamento de nidificação e estrutura de ninhos de *Euglossa cordata* (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 187-198. 1992.

GARÓFALO, C.A., KERR, W.E. Sex determination in bees. I. Balance between femaleness and maleness genes in *Bombus atratus*. **Genetica**, v. 45, p. 203-209. 1975.

GOMES, L.F., BRITO, R.M., POMPOLO, S.G., CAMPOS, L.A., PERUQUETTI, R.C. Determination of the karyotype and C-banding patterns of *Euplusia violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). **Anais do 42º Congresso Nacional de Genética**, v. 19, p. 122-1996.

GOMES, L.F., POMPOLO, S.G., PERUQUETTI, R.C., CAMPOS, L.A. Determination of the karyotype and C- and fluorochrome GC specific (CMA₃) banding patterns of *Euglossa townsendi* (Hymenoptera, Apidae). **Anais do 43º Congresso Nacional de Genética**, v. 20, p. 62-1997.

GOMES, L.F., BRITO, R.M., POMPOLO, S.G., CAMPOS, L.A., PERUQUETTI, R.C. Karyotype and C- and G-banding patterns of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). **Hereditas**, v. 128, p. 73-76. 1998.

KERR, W.E. A variação do número de cromossomos na evolução dos Hymenoptera. **Scientia Genetica**, v. 4, p. 182-190. 1952.

KIMSEY, L.S. The behavior of male orchid bees (Apidae, Hymenoptera, Insecta) and the question of leks. **Animal Behaviour**, v. 28, p. 996-1004. 1980.

KIMSEY, L.S., DRESSLER, R.L. Synonymic species list of Euglossini. **Pan-Pacific Entomologist**, v. 62, p. 229-236. 1986.

LÓPEZ-URIBE, M. M., ALMANZA, M. T., ORDOÑEZ, M. Diploid male frequencies in Colombian populations of euglossine bees. **Biotropica**. (OnlineEarly Articles). 2007. doi:10.1111/j.1744-7429.2007.00287.x

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

MICHENER, C.D. **The bees of the world.** Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 913p. 2000.

MILET-PINHEIRO, P., SCHLINDWEIN, C. Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 853-858. 2005.

MOURE, J.S. A key to the parasitic euglossine bees and a new species of *Exaerete* from Mexico (Hymenoptera-Apoidea). **Revista de Biologia Tropical**, v. 12, p. 15-18. 1964.

MYERS, J., LOVELESS, M.D. Nesting aggregations of the euglossine bee *Euplusia surinamensis* (Hymenoptera: Apidae): individual interactions and the advantage of living together. **The Canadian Entomologist**, v. 108, p. 1-6. 1976.

NEFF, J.L., SIMPSON, B.B. Diversity of native bees and agroecosystems. In: **Hymenoptera and biodiversity.** CAB International., Oxin, p. 143-167. 1993.

NEMÉSIO, A., FARIA JR, L.R.R. First assessment of the orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) at Parque Estadual do Rio Preto, a cerrado area in southeastern Brazil. **Lundiana**, v. 5, p. 113-117. 2004.

NEMÉSIO, A., SILVEIRA, F.A. Biogeographic notes on rare species of Euglossina (Hymenoptera : Apidae : Apini) occurring in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 117-120. 2004.

OTERO, J.T., SANDINO, J.C. Capture rates of male euglossine bees across a human intervention gradient, Choco region, Colombia. **Biotropica**, v. 35, p. 520-529. 2003.

PEREIRA-MARTINS, S.R. Biologia de *Eulaema nigrita*. 2. Atividades nidais. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 37, p. 237-243. 1991.

PEREIRA-MARTINS, S.R., KERR, W.E. Biologia de *Eulaema nigrita*. 1. Construção de células, oviposição e desenvolvimento. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 37, p. 227-235. 1991.

PERUQUETTI, R.C. **Padrões eletroforéticos em machos adultos de Euglossini (Hymenoptera: Apidae): variação gênica e diploidia.** pp. 59. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.1998.

POINAR, G.O., DANFORTH, B.N. A fossil bee from Early Cretaceous Burmese amber. **Science**, v. 314, p. 614-614. 2006.

POMPOLO, S.G., TAKAHASHI, C.S., KERR, W.E. Os cromossomos de *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). **Anais da Sociedade Brasileira do Progresso da Ciência**, v. 38, p. 885-1986.

RAMÍREZ, S., DRESSLER, R.L., OSPINA, M. Abejas euglosinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. **Biota Colombiana**, v. 3, p. 7-118. 2002.

ROBERTS, D.R., ALECRIM, W.D., HELLER, J.M., EHRHARDT, S.R., LIMA, J.B. Male *Eufriesea purpurata*, a DDT-collecting euglossine bee in Brazil. **Nature**, v. 297, p. 62-63. 1982.

ROBERTS, R.B., DODSON, C.H. Nesting biology of two communal bees, *Euglossa imperialis* and *Euglossa ignita* (Hymenoptera: Apidae), including description of larvae. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 60, p. 1007-1014. 1967.

ROUBIK, D.W., WEIGT, L.A., BONILLA, M.A. Population genetics, diploid males, and limits to social evolution of euglossine bees. **Evolution**, v. 50, p. 931-935. 1996.

SANTOS, M.L., GARÓFALO, C.A. Nesting biology and nest re-use of *Eulaema nigrita* (Hymenoptera: Apidae, Euglossini). **Insectes Sociaux**, v. 41, p. 99-110. 1994.

SILVA, I.O. **Espécies de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) coletadas em fragmentos da floresta Amazônica: Variação Genética e Diploidia**. pp. 72. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, Brazil., São Carlos, SP, Brasil, 2002.

TAKAHASHI, N.C., PERUQUETTI, R.C., DEL LAMA, M.A., CAMPOS, L.A. A reanalysis of diploid male frequencies in euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). **Evolution**, v. 55, p. 1897-1899. 2001.

TARELHO, Z.V.S. **Contribuição ao estudo citogenético dos Apoidea**. pp. 75. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo., Ribeirão Preto, SP, 1973.

WHITE, M.J.D. **Animal cytology and evolution**. Cambridge University Press, Cambridge, pp.1973.

WHITING, P.W. Multiple Alleles In Complementary Sex Determination of Habrobracon.

Genetics, v. 28, p. 365-382. 1943.

WILSON, E.O. **The insect societies**. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, pp.548, 1971.

ZAYED, A., ROUBIK, D.W., PACKER, L. Use of diploid male frequency data as an indicator of pollinator decline. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 271, p. S9-S12. 2004.

ZUCCHI, R., SAKAGAMI, S.F., CAMARGO, J.M. Biological observations on a Neotropical parasocial bee, *Eulaema nigrita*, with a review on the biology of Euglossinae (Hymenoptera, Apidae). A comparative study. **Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Series VI, Zoology**, v. 17, p. 271-380. 1969.