

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

**Biologia de nidificação e estrutura sociogenética de ninhos de**

***Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804**

**(Hymenoptera: Crabronidae): comportamento de guarda do  
macho e paternidade**

**Juliano Costa de Almeida**

**SÃO CARLOS - SP**

**2010**

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

**Biologia de nidificação e estrutura sociogenética de ninhos de  
*Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera:  
Crabronidae): comportamento de guarda do macho e paternidade**

**Juliano Costa de Almeida**

**Dissertação apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Evolução da  
Universidade Federal de São  
Carlos como parte dos requisitos  
para a obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Evolução,  
Área de Concentração: Genética e  
Evolução.**

**Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama**

**SÃO CARLOS - SP**

**2010**

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

A447bn

Almeida, Juliano Costa de.

Biologia de nidificação e estrutura sociogenética de ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804 (Hymenoptera: Crabronidae) : comportamento de guarda do macho e paternidade / Juliano Costa de Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

88 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Evolução. 2. Inseto. 3. Microsatélite. 4. Ecologia. 5. Genética. I. Título.

CDD: 575 (20<sup>a</sup>)

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

**BIOLOGIA DE NIDIFICAÇÃO E ESTRUTURA  
SOCIOGENÉTICA DE NINHOS DE TRYPOXYLON  
(TRYPARGILUM) ALBITARSE FABRICIUS 1804  
(HYMENOPTERA: CRABRONIDAE): COMPORTAMENTO DE  
GUARDA DO MACHO E PATERNIDADE.**

Dissertação de Mestrado de Juliano Costa de Almeida

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Lúcio Antonio Oliveira Campos

Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo

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

*“Quando realmente conhecer a unidade de uma coisa, entenderá outras dez mil”*

Musashi Miyamoto

*“Mono no aware”*

Motoori Norinaga

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha família, por todo o amor, criação, educação e vivência. Principalmente aos meus pais, Raimunda e Geraldo, por acreditarem em mim e permitirem que eu seguisse esse meu sonho. À Renata, minha irmã, pelo convívio, discussões e irmandade que nos fizeram cada vez mais próximos. À minha avó Dona Raimunda, pelo amor, incentivo e promessas em meu nome para que o trabalho do neto sempre desse certo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama, pela oportunidade, orientação, confiança e pelo exemplo profissional a ser seguido.

À Isabel, pela preparação dos géis, conversas e total paciência ao me ensinar as soluções do laboratório.

À equipe de prospecção dos microssatélites, Emeline, Alexandra e a Profa. Dra. Terumi Hatanaka.

À Profa. Dra. Mara Garcia Tavares e ao Prof. Dr. Lúcio Antonio de Oliveira Campos, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, por me receberem em seus laboratórios. Ao Helder, pelo convívio, disposição e ensinamentos, desde técnicas de extração de DNA a diferentes maneiras de se fazer observação e coleta a campo.

À Profa. Dra. Maria Luísa Tunes Buschini, do Departamento de Biologia da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava - PR, por ter me recebido em seu laboratório e pela disposição a sair a campo e me ensinar técnicas de marcação. Ao Renan, pela amizade, pelo lar de curta temporada e pela disposição em me ensinar as técnicas de marcação e de observação.

À Embrapa (Fazenda Canchim), por permitir que eu fizesse minhas observações e coletas em sua área.

À Profa. Dra. Angélica Maria Penteado Martins Dias, pela identificação do parasitóide.

Ao Dr. Antonio Domingos Brescovit, pela identificação das aranhas.

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Carlos A. Garófalo e Prof. Dr. Lucio A. de Oliveira Campos.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, às secretárias Greissi e Heloísa.

Aos meus amigos do laboratório, Kátia, Rogério, Thaís, Mariana, Natália, Otávio, Cíntia, Camilla, Keize, Juliana, Luana e Caito, pelo convívio, companheirismo, discussões e crescimento, tanto pessoal quanto profissional. Em especial a Mariana e ao Caito, pela dedicação e experiência compartilhada com os *Trypoxylon*.

Aos meus amigos do departamento, Carolina, Thais, Andiará, Emeline, Emmanuel, Regina, Samantha e Fernando por estarem comigo no dia-a-dia e terem contribuído de alguma forma para este trabalho.

A toda Bio03, pela vivência e ensinamentos proporcionados durante muitos anos, inclusive o saudosismo pós graduação. Em especial, a Camilla, Cíntia Oi, Juliana (Juzinha), Fernando, Marina, Pompe e Toshio.

Aos moradores da antiga república do PC do B, Takashi, Koba, Hideki, Allyson, Lucas, Daniel e Arthur, e da atual Zeca Urubu, André, Fábio, Flávio, Mario, Henrique e Junior, por todo o convívio do nosso lar. Em especial ao Allysson, por toda a amizade e discussões sobre a biologia.

Ao pessoal de Campinas por fazerem parte da minha vida durante todos esses anos e terem compartilhado suas vidas comigo. Em especial à turma do prédio, Renata (do 9), Fausto, Carina, Miguel, Aninha, Pedro, Carla, Tiago, Tássia, Hannay, Juliana, Renata (do 2), Daniel e Pedro (P2).

À UFSCar.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABELAS.....	6
1- INTRODUÇÃO GERAL .....	7
2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	11
3- CAPÍTULO 1: “Biologia de nidificação de <i>Trypoxylon (Trypargilum) albitarse</i> (Hymenoptera: Crabronidae)” .....	13
3.1- Introdução.....	13
3.2- Material e métodos .....	14
3.2.1- Áreas de estudo .....	14
3.2.2- Amostragem .....	15
3.2.3- Análise dos resultados .....	16
3.3- Resultados e discussão.....	16
3.3.1- Comportamento de nidificação .....	17
3.3.2- Produtividade de nidificação .....	24
3.3.3- Ciclo de vida.....	29
3.3.4- Investimento parental .....	40
4- CAPÍTULO 2: “Marcadores microsatélites para a espécie <i>Trypoxylon (Trypargilum)</i> <i>albitarse</i> (Hymenoptera: Crabronidae)” .....	48
5- CAPÍTULO 3: “Comportamento de macho-guarda e paternidade em ninhos de <i>Trypoxylon</i> <i>(Trypargilum) albitarse</i> (Hymenoptera: Crabronidae)” .....	54
5.1- Introdução.....	54
5.2- Material e métodos .....	55
5.2.1- Análise genética por locos microsatélites.....	55
5.2.2- Teste de robustez dos dados genéticos.....	56
5.2.3- Estrutura genética dos ninhos .....	56
5.3- Resultados e discussão.....	57
5.3.1- Teste de robustez .....	58
5.3.2- Comportamento de Guarda, paternidade e estrutura sociogenética dos ninhos ...	60
5.3.3- Sistema de Acasalamento.....	72
5.3.4- Machos diplóides.....	75
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....	80
7- BIBLIOGRAFIA.....	82



## RESUMO

Vespas crabronídeas do gênero *Trypoxylon* se caracterizam por serem solitárias e nidificarem em cavidades pré-existentes ou em ninhos de barro. A espécie *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* está incluída no segundo grupo, pois exclusivamente constrói seus ninhos. Esses são constituídos por tubos de barro com a porção inferior aberta. São formados internamente por uma série linear de células aprovisionadas com aranhas capturadas, sobre uma das quais ela oviposita um ovo para, então, começar o fechamento da célula com uma parede de barro e iniciar o aprovisionamento da célula seguinte. Os machos dessas vespas possuem um comportamento incomum entre os himenópteros. Eles auxiliam as fêmeas na construção e no aprovisionamento de seus ninhos, além de permanecerem nestes até o seu término, expulsando parasitóides ou outros machos que eventualmente se aproximem do ninho. Essa peculiaridade do macho-guarda sempre foi associada à sua paternidade da prole feminina do ninho que guardava. No entanto, esta hipótese até hoje não fora testada, constituindo assim, o objetivo principal deste trabalho. Neste, foi acompanhado o comportamento de nidificação da espécie *Trypoxylon albitarse* e, para tal, foram necessárias a observação de casais nidificando e a coleta dos mesmos e de suas proles. Os adultos capturados foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise genética. A prole foi coletada após a formação do casulo e, após a sua emergência, ela foi pesada, sexada e congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para o mesmo fim. O acompanhamento do processo de nidificação permitiu colher dados desta espécie que constrói ninhos expostos, complementando a maioria dos trabalhos realizados no gênero que se baseiam em espécies que nidificam em ninhos armadilha. Foi observado maior atividade de nidificação na época fria e seca do ano, a emergência dos adultos se concentra principalmente em dois momentos, imediatamente antes e após o inverno, além de que, a maior parte dos indivíduos passa por um estado de quiescência no estado de larva durante essa época. Uma razão sexual secundária 1:1 foi observada nas duas populações amostradas, São Carlos e Araras. Porém a alocação de recursos foi maior para as fêmeas, já que elas são em média 28% maiores que os machos. Para os testes genéticos de paternidade, foi necessário desenvolver uma biblioteca genômica para *Trypoxylon albitarse*, o que permitiu o desenvolvimento de oito marcadores de regiões de microssatélites, dos quais quatro foram polimórficos e suficientes para as análises necessárias. Essas ferramentas genéticas foram as primeiras a serem desenvolvidas para o gênero. Elas, em conjunto com as observações a campo, permitiram atribuir a prole feminina de um ninho ao macho que o guardou. No entanto, usurpações e cópulas extra-par também foram evidenciadas, contribuindo para o maior conhecimento do sistema de acasalamento na espécie e para o entendimento do significado funcional do comportamento de guarda. A ocorrência de machos diplóides foi detectada e sua origem discutida.

## ABSTRACT

Crabronid wasps of the genus *Trypoxylon* are characterized by being solitary and nest in pre-existing cavities or in mud nests. The species *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* is included in the latter group, because builds its own mud nests. These nests are made by mud tubes with the lower portion open. Each tube is internally formed by a linear series of cells provisioned with captured spiders in which she oviposits an egg. After that, she starts closing the cell with a mud wall and begins to supply the next cell. Males of these wasps have an unusual behavior among the Hymenoptera. They assist the females during the construction and the provisioning of their nests, besides expelling parasites or other males who eventually approach the nest. This peculiarity of the male guard was always associated with his paternity of female offspring of the guarded nest. However, this hypothesis has not been tested until now, doing this the main objective of this work. The nesting behavior of the species *Trypoxylon albitarse* was monitored. For this, it took the observation of the nesting pairs and their collecting, as the collect of their offspring. The adults caught were frozen at -20°C for the genetic analysis. The offspring was collected after the construction of the cocoon and, after its emergence, it was weighted and frozen at -20°C for the same purpose. The monitoring of nesting allowed gathering data from this species, adding information to this gender, since most of that is gathered with trap nests. It was seen that that species have more nesting activity in cold and dry seasons, the emergence of adults is mainly concentrated in two moments, before and after the winter. Besides that, most of the larvae spend the winter in a quiescence state. A secondary sex ratio 1:1 was observed in two populations, São Carlos and Araras, however the resource allocation was higher for females, since they are 28% larger than males. To the paternity tests of the guard male, it was necessary to develop a genomic library for *Trypoxylon albitarse*, which allowed the development of eight microsatellite markers. Four of those were polymorphic and good enough to the purpose of these tests. These genetic tools were the first developed for this gender. They, together with the field observations, allowed assigning the female offspring of a nest to the male who guarded it. However, usurpation and extra-pair copulations were also found, contributing for greater understanding of mating system in this species and the understanding of the functional significance of the male guard behavior. The occurrence of diploid males was detected and their origin discussed.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1) Imagens das diferentes fases de construção de um ninho de <i>Trypoxylon (Trypargilum) albitarse</i> . Ele pode ser formado por diversos tubos de barro, no caso 5 tubos. Nesse exemplo, um só casal aprovionou 15 células de cria. (Fotos: Juliano Almeida) .....	16
Figura 2) Fêmea de <i>Trypoxylon albitarse</i> chegando com barro em um tubo que está sendo estendido. Notar a região com barro ainda fresco que marca o ponto em que iniciou a extensão do tubo. (Foto: Juliano Almeida) .....	18
Figura 3) Fêmea de <i>Trypoxylon albitarse</i> construindo o tubo de barro. Notar que as linhas paralelas de barro que constituem o tubo são sempre espalhadas do centro para a direita e do centro para a esquerda, alternadamente. (Foto: Juliano Almeida) .....	19
Figura 4) Macho de <i>Trypoxylon albitarse</i> alisando o barro recém espalhado pela fêmea. (Foto: Juliano Almeida) .....	20
Figura 5) Macho de <i>Trypoxylon albitarse</i> em posição padrão de guarda dentro do ninho. (Foto: Juliano Almeida) .....	21
Figura 6) Células de cria escavadas de um tubo de barro de <i>Trypoxylon albitarse</i> . Na célula superior há uma larva se alimentando das aranhas. Na célula inferior é possível visualizar a deposição de barro que a fêmea faz antes de iniciar o aprovisionamento das células. (Foto: Juliano Almeida) .....	22
Figura 7) Fêmeas de <i>Trypoxylon albitarse</i> chegando ao tubo de barro com uma aranha paralisada. (Fotos: Juliano Almeida) .....	23
Figura 8) Macho de <i>Trypoxylon albitarse</i> tocando a porção final do abdômen da fêmea enquanto essa aprovisiona a aranha recém levada ao tubo de barro. (Foto: Juliano Almeida).....	23
Figura 9) Distribuição do comprimento das células de cria para cada sexo (n= 59 células de fêmeas; n= 87 células de machos). Foram usados dois desvios padrão, pois a distribuição demonstra 95% das amostras de cada sexo e minimiza a chance de erro na inferência do sexo baseado no comprimento da célula de cria. ....	25
Figura 11) Gráfico de correlação entre precipitação média (mm/m <sup>2</sup> ) no eixo X, fotoperíodo médio (minutos diários) no eixo Z, e construção média de ninhos de barro (cm) no eixo Y (Multiplo R z/xy= 07935; p= 0,0114). A precipitação média mensal e a temperatura média mensal (não está no gráfico) apresentaram alta correlação (r <sup>2</sup> = 0,4529; r= 0,6730; p= 0,0165), portanto ela não altera significativamente os resultados deste gráfico. Dados de precipitação foram obtidos no site " <a href="http://www.cppse.embrapa.br/050pesquisa/bovinos-da-raca-canchim/origem">http://www.cppse.embrapa.br/050pesquisa/bovinos-da-raca-canchim/origem</a> ". Todos os dados são referentes à cidade de São Carlos. ....	29
Figura 12) Ninho de <i>Trypoxylon albitarse</i> constituído por 11 tubos de barro. Esses orifícios, escavados pelos adultos recém emergidos, permitem estipular com precisão em qual célula de cria houve a emergência e a sua data. (Foto: Juliano Almeida) .....	30
Figura 13) Tempo de desenvolvimento (em dias) ao longo do ano em São Carlos (n= 95 indivíduos). ....	31
Figura 14) Distribuição dos emergentes ao longo do ano em São Carlos. Os meses de Abril a Setembro correspondem à estação fria e seca; entre Outubro e Março, a estação quente e úmida (n= 95 indivíduos). ....	32
Figura 15) Tempo de desenvolvimento de fêmeas (n= 144) e machos (n= 159). ....	33
Figura 16) Correlação entre massa corpórea e tempo de desenvolvimento de machos (a) e fêmeas (b) (n= 159 machos e 144 fêmeas).....	34
Figura 17) Razão entre o 'potencial mensal de nidificação' e emergência com os dados de São Carlos. O eixo X cruza com o eixo Y no valor da razão média do ano (1,67), assim é possível observar com maior destaque o momento pelo qual a população passa a cada mês. ....	36
Figura 18) Fêmea de <i>Brachymeria villosa</i> (Chalcididae) escavando um tubo de barro e ovipositando em seguida. Os orifícios da primeira imagem são células já parasitadas por essa fêmea. (Fotos: Juliano Almeida) .....	39
Figura 19) O Macho de <i>Trypoxylon albitarse</i> não saiu do ninho para expulsar o parasitóide ( <i>Brachymeria villosa</i> – Hymenoptera: Chalcididae). Ele ficou zumbindo o tempo todo, porém não saiu do ninho, permanecendo postado na entrada do tubo de barro. (Foto: Juliano Almeida).....	39
Figura 20) Distribuição da massa corpórea dos emergentes de São Carlos (n= 214 indivíduos). ....	44
Figura 21) Distribuição da massa corpórea dos emergentes de Araras (n= 98 indivíduos). ....	44

Figura 22) Variação da massa corpórea de machos e fêmeas ao longo do ano na cidade de São Carlos (n= 94 indivíduos). .....	45
Figura 23) Cópula em <i>Trypoxylon agamemnon</i> (foto de cima) (foto tirada no Parque das Araucárias, Guarapuava – PR) e em <i>Trypoxylon rogenhoferi</i> (foto de baixo) (foto tirada na fazenda Canchim – Embrapa, São Carlos – SP); nos dois casos, as fêmeas haviam acabado de chegar com uma aranha ao ninho. (Foto: Juliano Almeida).....	65
Figura 24) Dois machos de <i>Trypoxylon aurifrons</i> lutando; o macho de baixo é um patrulheiro que estava tentando ocupar a célula de cria no tubo de barro já ocupado por um macho-guarda. (Foto: Juliano Almeida) .....	70
Figura 25) Macho de <i>Trypoxylon albitarse</i> alisando a parte interna da parede do ninho recém construída enquanto a fêmea buscava mais barro para a construção do tubo. (Foto: Juliano Almeida) ...	72
Figura 26) Macho de <i>Trypoxylon nitidum</i> postado à entrada da célula de cria o qual estava de guarda. Essa postura é feita quando há um macho patrulhando próximo ao ninho. O mesmo padrão de postura foi observado em <i>T. aurifrons</i> e <i>T. albitarse</i> . (Foto: Juliano Almeida).....	74
Figura 27) Distribuição da massa corpórea de machos e fêmeas dos ninhos analisados. Foram usadas distribuições com dois desvios padrão para representar 95% das amostras e aumentar a acurácia da análise (n= 284 indivíduos).....	78
Figura 28) Comparação da taxa de emergência dos ninhos com e sem machos diplóide (n=22 ninhos). .	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1) Presas coletadas no interior de células de cria de <i>Trypoxylon albitarse</i> . .....	22
Tabela 2) Bionomia comparada de espécies do grupo Albitarse (média/±desvio padrão).....	26
Tabela 3) Comparativo de mortalidade entre Araras e São Carlos e entre laboratório e campo da cidade de São Carlos. ....	38
Tabela 4) Sequência dos sexos ovipositados nos ninhos de São Carlos. ....	42
Tabela 5) Sequência dos sexos ovipositados nos ninhos de Araras. ....	42
Tabela 6) Características das regiões de microssatélites isoladas para <i>Trypoxylon (Trypargilum) albitarse</i> . ....	52
Tabela 7) Resultados de testes de amplificação heteróloga utilizando <i>primers</i> de <i>Trypoxylon (Trypargilum) albitarse</i> . As amplificações foram testadas em dois indivíduos de cada espécie. ....	53
Tabela 8) Tabela produzida pelo teste de atribuição do Arlequin para demonstrar como são apresentados os resultados. Quanto maior o valor, maior é a chance do indivíduo pertencer ao ninho indicado (primeira linha, em negrito). Essa tabela é referente aos valores dos indivíduos do ninho 17. ....	59
Tabela 9) Resumo dos resultados da análise da estrutura genética dos ninhos. A captura dos adultos ocorreu durante a nidificação da última célula e a da prole 35 dias após o término do ninho. DP = desvio padrão. ....	61
Tabela 10) Diversidade de tipos de ninhos encontrados, usando o loco <i>Talb07</i> como exemplo. a) prole pertencente a somente um casal; b) célula de cria na porção central do ninho indicando usurpação (negrito); c) estrutura genética do ninho evidenciando nidificação sequencial de duas fêmeas (uma em itálico e a outra em negrito), no caso com o mesmo pai (guarda); d) células de cria indicando cópulas extra-par da fêmea com algum patrulheiro (negrito). Na prole, os machos haplóides estão em azul e as fêmeas diplóides em vermelho. ....	62
Tabela 11) Resumo dos dados referentes aos machos diplóides. Na coluna da direita encontra-se a quantidade de indivíduos formados pelo tipo de união correspondente da coluna da esquerda. Cada união de macho e fêmea se refere a um casal formado que gerou pelo menos um indivíduo diplóide. Ela pode ser formada entre uma fêmea e o macho-guarda (ninho) ou entre uma fêmea e um patrulheiro (cópula extra-par). ....	77

## 1- INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as ordens da classe Insecta, a Ordem Hymenoptera é uma das mais conhecidas, pois agrupa espécies que são importantes agentes polinizadores, produtores de cera, mel, própolis, veneno, entre outros compostos e também por serem, em grande parte, pragas agrícolas ou parasitóides de pragas de importantes culturas.

Esta Ordem é constituída pela Subordem Symphyta e Subordem Apocrita. Esta última se divide em dois grupos, Parasítica e Aculeata. O primeiro é representado por espécies parasitóides e o segundo por espécies que são, ou foram no passado evolutivo, capazes de ferocar (Gauld & Bolton 1996). Este último grupo inclui os himenópteros mais conhecidos - as abelhas, vespas e formigas.

Os himenópteros têm como uma de suas principais características o mecanismo haplodiplóide de determinação do sexo por partenogênese arrenótoca, ou seja, usualmente óvulos fecundados originam fêmeas ( $2n$ ) e óvulos não fecundados geram machos ( $n$ ). Por isso, nas fêmeas a gametogênese ocorre de maneira usual, com a meiose resultando em gametas haplóides e nos machos, por apresentarem somente um conjunto cromossômico, a meiose não apresenta o caráter reducional (Gauld & Bolton 1996).

Essa característica produz algumas consequências para os himenópteros. A primeira delas é a maior facilidade na eliminação de genes recessivos deletérios de uma população - alelos deletérios são necessariamente expressos e eliminados conjuntamente com os machos, já que são haplóides (Havron *et al.* 1987).

Outra consequência dessa característica é a capacidade da fêmea de influenciar o sexo da sua prole. De acordo com Flanders (1956) e Gerber & Klostermeyer (1970), momentos antes da oviposição a fêmea pode escolher pressionar ou não a espermateca e liberar o esperma que estava ali armazenado, a fim de fecundar o óvulo a ser depositado; dessa forma, ela poderia definir o sexo da cria. Essa escolha é, na maioria das vezes, influenciada por fatores

externos como a disponibilidade de alimento (Charnov 1982; Gauld & Bolton 1996). Brockmann & Grafen (1989) e Molumby (1996) relataram que a razão sexual da prole em *Trypoxylon (Trypoxylon) politum* pode estar associada à quantidade de recursos disponíveis, uma vez que óvulos fecundados foram ovipositados em células nas quais se encontrava maior massa de aranhas capturadas, enquanto que óvulos não fecundados estavam depositados em células com menor massa de aranhas. Acredita-se que, dessa forma, o valor adaptativo das fêmeas nidificadoras seja aumentado, uma vez que as maiores caçam mais, mais rapidamente e aprovisionam aranhas maiores do que as nidificadoras menores (Peruquetti & Del Lama 2003a).

A terceira consequência da haplodiploidia arrenótoca é a assimetria de parentesco entre os indivíduos da prole de um casal monogâmico. Nesse caso, as filhas compartilham entre si, em média, 75% do material genético (25% proveniente da mãe e 50% proveniente do pai), e, em média, 25% do material genético com seus irmãos (25% proveniente da mãe e 0% proveniente do pai) (Hamilton 1964). Essas diferenças podem gerar conflitos de interesse no momento da determinação do sexo da prole entre o macho e a fêmea (Trivers & Hare 1976; Brockmann & Grafen 1989), pois, enquanto ela compartilha, em média, 50% do material genético com ambos os sexos da prole, ele só compartilha seu material genético com as filhas. Isso pode acarretar em estratégias, por parte dele, para desviar a razão sexual da prole a favor das filhas.

Essa assimetria de parentesco parece ser uma das condições favoráveis à evolução da socialidade nessa ordem (Hamilton 1964), visto que, apenas entre as abelhas, a eussocialidade surgiu, pelo menos, 13 vezes independentemente (Michener 1974). Outras causas favoráveis devem ser o cuidado materno e a construção de ninhos. Evans & Eberhard (1970) afirmam haver correlação entre o grau de socialidade e os tipos de ninhos encontrados nas espécies. É sabido também que a construção de ninhos é um tipo de cuidado materno (Ross & Matthews 1991). Por exemplo, em vespas solitárias, o modo pelo qual as fêmeas mantêm suas crias

próximas às presas e como constroem ambientes que mantêm um microclima favorável ao seu desenvolvimento e bem protegido de predadores e parasitóides, é um forte indicativo desse cuidado materno (Ross & Matthews 1991).

Brockmann (1980), estudando *Trypoxylon (Trypargilum) politum*, uma vespa solitária, pela primeira vez tentou associar o processo de nidificação no gênero *Trypoxylon* e a origem da socialidade, já que este gênero é um dos representantes diretos dos ancestrais vespiformes dos atuais himenópteros eussociais. Essa espécie se mostrou favorável por apresentar grande plasticidade para construção de ninhos com cinco diferentes estratégias. Em nenhuma outra espécie do gênero foi encontrada tal plasticidade, apesar de a maior parte dos estudos que descrevem a nidificação nessas espécies se basearem nas que nidificam em ninhos armadilha. Sendo assim, este trabalho visou caracterizar a biologia de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* Fabricius 1804, uma vespa solitária, encontrada em toda a América do Sul, que constrói ninhos de barro expostos (Coville 1982), e assim contribuir para o melhor conhecimento da biologia desse gênero.

As fêmeas do subgênero *Trypargilum* nidificam em cavidades compridas e estreitas que podem ser pré-existentes ou construídas por elas com barro. Elas formam células de cria lineares, separadas por paredes de barro e aprovisionadas com aranhas que servem de alimento às larvas. Em cada célula de cria é ovipositado um ovo ao final do seu aprovisionamento. No decorrer da fase de nidificação, os machos desse subgênero auxiliam as fêmeas na construção e no aprovisionamento, além de apresentarem o comportamento de guarda do ninho, evitando a aproximação de parasitóides, predadores e de indivíduos da mesma espécie ou de outras (Brockmann 1980). Acredita-se que, desta forma, ele tem a chance de copular repetidamente com a fêmea durante o aprovisionamento (Coville & Coville 1980, Brockmann & Grafen 1989, Amarante 1991, Brockmann 1992) e, com isso, garantir a paternidade da prole feminina.



O comportamento de auxílio e participação dos machos na nidificação é incomum entre os insetos (Wilson 1971). Contudo, além deste comportamento observado em espécies de *Trypargilum*, também é observado que não há fidelidade da fêmea em relação ao macho-guarda, já que ela copula também com outros machos (Coville & Coville 1980; Brockmann & Grafen 1989; Amarante 1991; Brockmann 1992). Assim, dúvidas quanto ao sistema de acasalamento genético e a paternidade do ninho em relação à prole feminina levantam a questão sobre a razão ou razões dos machos despenderem energia atuando como guarda, ao invés de simplesmente copularem com a fêmea e a abandonar, como a maioria dos machos de insetos o faz (Thornhill & Alcock 1983).

## 2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O esclarecimento do significado funcional do comportamento de macho-guarda é elemento chave para o entendimento da biologia de nidificação em muitas espécies de *Trypoxylon*. Um melhor entendimento da origem e manutenção deste comportamento requer que seja estabelecida a estrutura sociogenética dos ninhos, incluindo aqui o sistema de acasalamento e a paternidade da cria.

Estudos sobre os comportamentos de nidificação e do macho-guarda nesse gênero já vêm sendo feitos desde 1934 (Richards 1934). Entre estes, incluem-se os desenvolvidos em nosso laboratório (Peruquetti 2003; Peruquetti & Del Lama 2003a; Peruquetti & Del Lama 2003b; Santoni 2008; Santoni & Del Lama 2007; Santoni *et al* 2009). No entanto, faltam informações sobre a genética familiar. Peruquetti (2003) e Santoni (2008), utilizando marcadores alozímicos, estimaram o parentesco médio dos ninhos para espécies desse gênero; porém, devido ao baixo polimorfismo do marcador utilizado, a paternidade da cria desses ninhos só pode ser atribuída ao macho-guarda em algumas situações.

Para esse tipo de estudo é bastante aconselhado o uso de regiões de microssatélites (Queller *et al.* 1993; Pederson & Boomsma 1999; Hughes 1998), as quais consistem de sequências curtas e repetidas em tandem do DNA nuclear e que geralmente apresentam alta diversidade alélica (Queller *et al* 1993). Atualmente, para a família Crabronidae só há marcadores microssatélites para *Philanthus triangulum* (Kantenpoth *et al.* 2004) e *Microstigmus nigrophthalmus* (Lucas *et al.* 2009).

No sentido de melhor compreender a biologia de nidificação, este trabalho teve por objetivo corroborar a hipótese de que o comportamento de guarda exibido pelo macho de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* lhe garante a paternidade da prole feminina gerada pela fêmea com a qual ele interage. Portanto, o que se deseja determinar é a estrutura sociogenética dos ninhos amostrados. Para que este objetivo geral possa ser cumprido, o

trabalho envolveu a execução de três atividades principais que serão descritas em três capítulos distintos. No primeiro, intitulado “Biologia de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)”, será descrito o processo de nidificação. O segundo, intitulado “Marcadores microssatélites para a espécie *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)”, descreve o desenvolvimento de marcadores microssatélites e os testes de transferibilidade para outras espécies do gênero, já que não existem marcadores para o mesmo. No terceiro capítulo, intitulado “Comportamento de macho-guarda e paternidade em ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)”, serão reportados os comportamentos de interações fêmeas - machos, machos - machos e machos - parasitóides e as análises para verificação da estrutura genética familiar e do papel genético do macho-guarda dos ninhos.

### 3- CAPÍTULO 1: “Biologia de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)”

#### 3.1- Introdução

O ninho de vespas e abelhas é uma característica muito estudada, já que desempenha papel central na vida desses insetos. Ele pode significar proteção, alimento, local de referência para retornos e, muitas vezes, cópulas (Ross & Matthews 1991). Além disso, também representam um “comportamento cristalizado” por ser a construção física de algo não aprendido, principalmente em espécies em que não há sobreposição de gerações (Evans & Eberhard 1970). Evans e Eberhard (1970) acreditavam haver associação entre os tipos de ninhos de uma espécie e o seu grau de socialidade. Isso porque, de certa maneira, a socialidade desses insetos é consequência de algumas condições favoráveis desse grupo. Entre estas, a assimetria de parentesco e o cuidado parental, sendo este último entendido como o modo pelo qual as fêmeas mantêm suas crias próximas às presas, constroem ambientes que produzem um microclima favorável ao seu desenvolvimento e bem protegidos de predadores e parasitóides (Ross & Matthews 1991). Juntamente disso, acredita-se que as atuais vespas solitárias da superfamília Apoidea se assemelhem com os ancestrais vespiformes das atuais abelhas e vespas eussociais. Assim, o estudo da diversidade da biologia de nidificação, bem como da estrutura sociogenética dos ninhos dessas vespas, pode auxiliar na elucidação da origem da eussocialidade nos himenópteros (Ross & Matthews 1991).

Brockmann (1980) já buscava determinar tal origem estudando a diversidade do comportamento de nidificação em *Trypoxylon (Trypargilum) politum*. Esta vespa solitária da família Crabronidae apresenta grande plasticidade nas estratégias de nidificação. Cinco diferentes padrões foram descritos: construção de ninhos, nidificação em cavidades pré-existentes, nidificação conjunta, reutilização de ninhos e usurpação. Este fato é suficiente para tornar o grupo a que essa espécie pertence interessante. O atual entendimento da biologia de

nidificação nesse gênero é baseado em sua maioria em espécies que nidificam em cavidades pré-existentes (ninho armadilha) pela facilidade de coleta. Para melhorar esse entendimento é necessário a obtenção de mais dados dessas espécies que constroem os ninhos expostos, já que as informações a respeito delas são esparsas na literatura.

Sendo assim, a espécie *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* foi escolhida como alvo de estudo por ser uma espécie que nidifica somente em ninhos de barro construídos por ela mesma. Na fase de nidificação, as fêmeas constroem um tubo cilíndrico de barro, com a parte inferior aberta para formar células de cria provisionadas de maneira massal com aranhas capturadas. Durante o provisionamento, há sempre a presença de um macho no ninho. Nesse subgênero, eles auxiliam as fêmeas durante essa fase e também fazem o comportamento de guarda do ninho, afastando predadores, parasitóides e outros machos. Dessa forma, nesse capítulo há a descrição do processo de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Para tanto, foi necessário observar e descrever como os ninhos são construídos e provisionados, caracterizar a prole e obter evidências do cuidado materno.

### **3.2- Material e métodos**

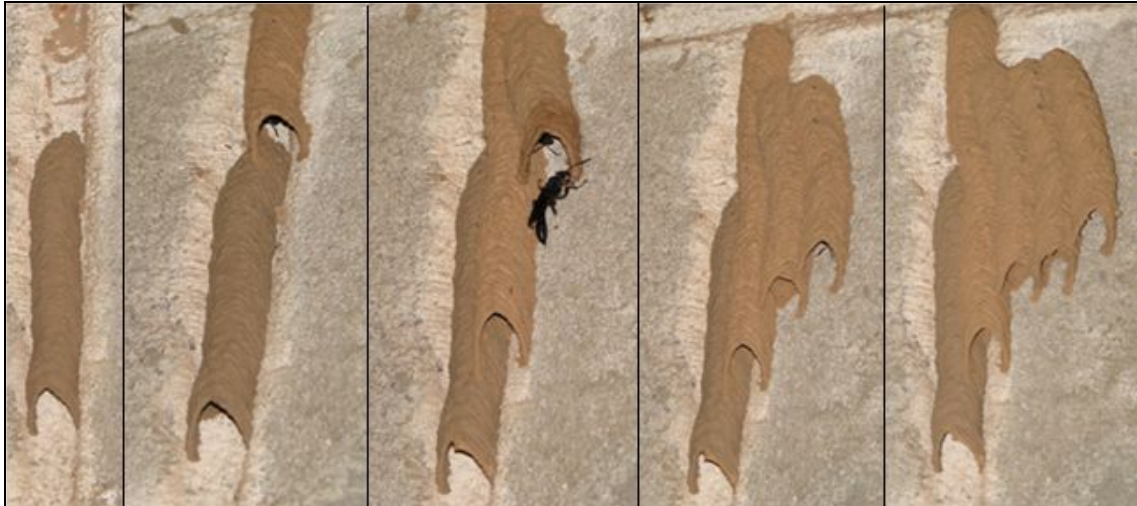
#### **3.2.1- Áreas de estudo**

Este estudo foi conduzido em dois locais da cidade de São Carlos - SP: no campus da Universidade Federal de São Carlos (latitude 22° 01'S e longitude 47° 53'W), em paredes de prédios, cobertas e sombreadas, e na Fazenda Canchim, EMBRAPA (latitude 22° 01'S e longitude 47° 53'W), na parte interna dos estábulos.

Alguns ninhos também foram coletados na cidade de Araras - SP, entre Março e Agosto de 2007, no campus da Universidade Federal de São Carlos, (latitude 22° 18'S e longitude 47° 22'W) em locais cobertos e sombreados.

### 3.2.2- Amostragem

Visitas rotineiras foram feitas nos locais de estudo, principalmente no campus UFSCar de São Carlos, entre os anos de 2005 e 2009. Ninhos que estavam em construção receberam total atenção e acompanhamento por todo o processo de nidificação. Anotações, registros de vídeo e fotográfico permitiram a formação de um banco de dados e imagens tanto do desenvolvimento dos ninhos quanto do comportamento de nidificação do casal (Figura 1). Cada ninho teve seus dados de arquitetura anotados, como comprimento, largura e quantidade de tubos, e foram periodicamente conferidos, tendo em vista que outras fêmeas podem estender ninhos já construídos. Ao final do processo de nidificação, quando possível, o casal foi capturado e os espécimes foram colocados em frascos individuais, etiquetados e levados ao laboratório onde foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As pupas foram coletadas 35 dias após o término do ninho que era o tempo suficiente para as larvas emergirem dos ovos e depois empuparem. Logo após a sua emergência, cada adulto foi sexado e imediatamente estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extração do seu DNA. Algumas células de cria foram escavadas para a coleta das aranhas provisionadas, a fim de identificar as presas de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Estas foram estocadas em tubos plásticos, armazenadas em álcool 70% e posteriormente identificadas pelo Dr. Antonio Domingos Brescovit (Instituto Butantã - São Paulo). Observações esparsas de outras espécies de *Trypoxylon (T. aurifrons, T. lactitarse, T. nitidum e T. rogenhoferi)* também foram feitas a campo.



**Figura 1)** Imagens das diferentes fases de construção de um ninho de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Ele pode ser formado por diversos tubos de barro, no caso 5 tubos. Nesse exemplo, um casal aprovionou 15 células de cria. (Fotos: Juliano Almeida)

### 3.2.3- Análise dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com Zar (1999), considerando nível de significância de 5% e conduzidas no programa STATISTICA 7. Para os testes de igualdade, como proporção de machos e fêmeas emergentes de cada mês, foi usado o teste de  $\chi^2$  (qui-quadrado). O teste t de Student, para distribuições paramétricas, ou o teste de Kruskal-Wallis, para distribuições não paramétricas, foram usados para comparações baseadas em valores, como atividade de nidificação em diferentes épocas do ano e atividade de construção de ninhos em diferentes estações. Para testar a normalidade das distribuições foi usado o teste de Shapiro-Wilk. Para as análises de correlação paramétricas a correlação de Pearson e para as não paramétricas a correlação de Spearman.

### 3.3- Resultados e discussão

### 3.3.1- Comportamento de nidificação

O comportamento de nidificação observado foi semelhante ao descrito para outras espécies do grupo *Albitarse*, que são basicamente espécies de *Trypargilum* construtores de tubos de barro (Cross *et al.* 1975 *apud* Camillo 1999), como *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Amarante 1991), *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Brockmann 1980), *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (Brockmann 1992), apesar dessa última construir e aprovisionar uma célula de cria por vez.

A atividade das fêmeas de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* ocorreu em dias ensolarados e se concentrou nas horas mais quentes do dia. Houve pouca atividade em dias nublados e não houve atividade em dias chuvosos. A fêmea iniciou o processo de nidificação escolhendo um local para a construção do tubo de barro. Ela ficou sobrevoando as paredes e tocando-as com as antenas. Quando encontrava um tubo já construído, ficava sobrevoando a entrada e, algumas vezes, entrava e saía rapidamente, para depois continuar sobrevoando o território. Depois de definido um local, ela começava a buscar barro para o início da construção. Para coletar o barro de uma poça, a fêmea usava as peças bucais para puxar o barro e as pernas para modelá-lo numa esfera, e durante o vôo usava as pernas dianteiras para transportá-lo (Figura 2).





**Figura 2)** Fêmea de *Trypoxylon albitarse* chegando com barro em um tubo que está sendo estendido. Notar a região com barro ainda fresco que marca o ponto em que iniciou a extensão do tubo. (Foto: Juliano Almeida)

Para construir o tubo, a fêmea usa cada bola de barro para formar metade de uma linha (do centro para a esquerda, ou do centro para a direita). Como o tubo é formado por diversas linhas de barro que são moldadas pelas peças bucais e pernas dianteiras, ela faz diversas viagens para coletar o barro. Essa repetição faz com que os tubos de barro tenham a aparência de canos em V invertido (Figura 3). Normalmente, as fêmeas se utilizam da mesma fonte de barro, o que caracteriza a coloração contínua de praticamente todos os tubos. Apesar de variar de acordo com a distância da fonte, elas demoravam por volta de três minutos para cada viagem de coleta. A construção de um tubo de barro demorou de um a quatro. Os machos, quando presentes na construção, faziam o acabamento interno dos tubos alisando a parte interna do mesmo enquanto a fêmea saía para buscar mais (Figura 4). Esse comportamento foi raramente observado nas fêmeas, porém quando iam reutilizar um tubo de barro abandonado, elas o revestiam internamente com barro. Talvez esse comportamento

de manter lisa a parte interna do tubo seja para facilitar a alocação das aranhas no processo de provisão.



**Figura 3)** Fêmea de *Trypoxylon albitarse* construindo o tubo de barro. Notar que as linhas paralelas de barro que constituem o tubo são sempre espalhadas do centro para a direita e do centro para a esquerda, alternadamente. (Foto: Juliano Almeida)



**Figura 4)** Macho de *Trypoxylon albitarse* alisando o barro recém espalhado pela fêmea. (Foto: Juliano Almeida)

Terminada a construção do tubo, a fêmea inicia a fase de provisionamento, a qual consiste na caça das aranhas que serão estocadas nas células de cria. Durante essa etapa, há sempre um macho-guarda presente no ninho (Figura 5), diferentemente da etapa anterior, quando a sua presença não foi obrigatória, como indicaram nossas observações. Não foi possível definir como ocorre a formação do casal, mas, provavelmente, a fêmea aceita o primeiro macho que surgir (Capítulo 3). Antes de caçar a primeira aranha, a fêmea deposita barro na parte superior da célula de cria (Figura 6), possivelmente para que a larva se utilize desse barro para a construção do seu pupário sem afetar a estrutura do tubo. Não foi possível observar presas sendo capturadas pelas fêmeas; porém, enquanto estavam caçando, ficavam sobrevoando e tocando com as antenas as paredes, telhados, galhos e diversos locais em que poderia haver teias de aranhas. Quando alguma teia era encontrada, ficava sobrevoando ao seu redor, algumas vezes pousava próximo e ela, a tocava e voltava a voar. As aranhas capturadas foram todas da família Araneidae, sendo fêmeas e jovens de espécies que constroem teias orbiculares, em sua maioria do gênero *Eustala sp* (Tabela 1). Depois de

caçadas, as aranhas eram carregadas pela fêmea até o tubo de barro com o auxílio dos três pares de pernas (Figura 7), sendo que apenas uma aranha é carregada por viagem. No retorno ao ninho, o casal fazia o reconhecimento por um toque de antenas. O macho saía para a fêmea entrar com a aranha e, logo em seguida entrava. Enquanto a fêmea ficava prensando a aranha no fundo da célula de cria, o macho mantinha as suas mandíbulas em contato com a porção final do abdômen dela (Figura 8). Por vezes, e ainda dentro do tubo, copulavam rapidamente antes da fêmea sair para caçar uma nova aranha. Em seguida, o macho se dirigia ao fundo da célula de cria e ficava prensando as aranhas, emitindo um zumbido. Na sequência, voltava à posição de guarda, até que a fêmea retornasse com a próxima aranha. O tempo de caça de uma aranha variou muito, desde 20 minutos até uma hora e meia. As aranhas foram caçadas e estocadas até completar a célula de cria. Pouco antes da oviposição, ela copulava com o macho-guarda dentro do tubo e depois de ovipositar um ovo sobre as aranhas, ela passava a buscar barro para fechar a célula de cria. Terminado esse processo, a fêmea reiniciava o provisionamento da célula seguinte. Todo esse processo se repetia até que todo o tubo de barro estivesse completo de células de cria.



**Figura 5)** Macho de *Trypoxylon albitarse* em posição padrão de guarda dentro do ninho. (Foto: Juliano Almeida)





**Figura 6)** Células de cria escavadas de um tubo de barro de *Trypoxylon albitarse*. Na célula superior há uma larva se alimentando das aranhas. Na célula inferior é possível visualizar a deposição de barro que a fêmea faz antes de iniciar o provisãoamento das células. (Foto: Juliano Almeida)

**Tabela 1)** Presas coletadas no interior de células de cria de *Trypoxylon albitarse*.

Família	Gênero		
		Fêmea	Jovem
Araneidae	<i>Eustala</i>	23	4
Araneidae	<i>Actinosoma</i>	1	-
Araneidae	<i>Neoscona</i>	2	-
Araneidae	não identificado	-	50



**Figura 7)** Fêmeas de *Trypoxylon albitarse* chegando ao tubo de barro com uma aranha paralisada. (Fotos: Juliano Almeida)



**Figura 8)** Macho de *Trypoxylon albitarse* tocando a porção final do abdômen da fêmea enquanto essa aprovisiona a aranha recém levada ao tubo de barro. (Foto: Juliano Almeida)

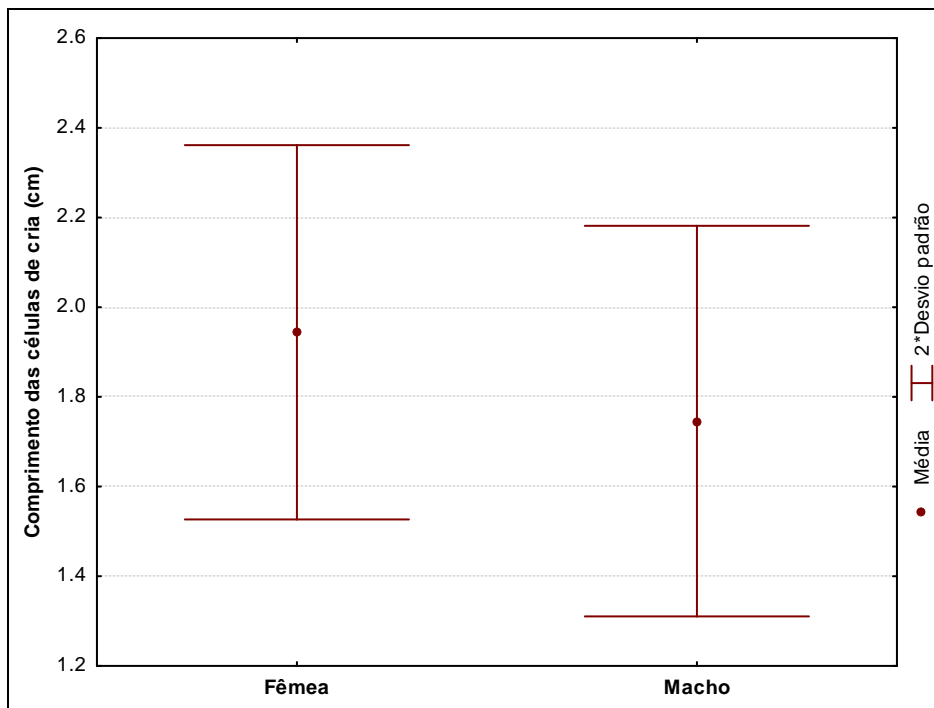
Quase sempre, enquanto a fêmea está coletando barro para finalizar a última célula de cria, o macho abandona a sua posição de guarda e se retira. Pelo o que foi observado, quando finalizado um tubo, a fêmea inicia a construção de outro ao lado ou abaixo do já construído, ou em algum local muito próximo (um ou dois metros afastado).

Os machos, durante todo esse processo de nidificação, ficam dentro do tubo exercendo a função de guarda. Na construção nem sempre estão presentes, porém, não foi observado nenhum tubo sendo provisionado sem a presença de algum macho-guarda. Enquanto eles estão dentro do tubo, se incomodados, emitem um zumbido agudo, como se fosse um *display* de defesa. Se muito perturbados, eles saem e atacam a fonte do distúrbio. Outras informações sobre o comportamento de guarda estão descritas no Capítulo 3.

### **3.3.2- Produtividade de nidificação**

Dados sobre a bionomia dos ninhos do grupo *Albitarse* são esparsos na literatura; portanto, informações desse caráter podem auxiliar estudos futuros no grupo. Neste trabalho foram encontrados, em média, 1,86 ( $\pm 1,28$  DP; n= 147 ninhos) tubos por ninho e 3,68 ( $\pm 2,63$  DP; n= 256 tubos) células por tubo. A média do comprimento dos tubos foi de 12,3 cm ( $\pm 6,99$  DP; n= 134 tubos) e a média do diâmetro das células de cria foi de 0,95 cm ( $\pm 0,1$  DP; n= 146 células), não havendo diferença estatística para os diâmetros entre as células que geraram machos e fêmeas (teste t: F= 3,7285; p=0,0554). O comprimento das células de cria de machos e fêmeas foi diferente (teste t: F= 30,093; p<0,01; machos = 1,75cm  $\pm 0,22$  DP; n=87; fêmeas = 1,95cm  $\pm 0,21$  DP; n=59). Como pode ser observado na Figura 9, há bastante sobreposição entre a distribuição do comprimento das células de machos e fêmeas. Entretanto, a parte da distribuição que não se sobrepõe permite a identificação do sexo do indivíduo que se

desenvolveu naquela célula, baseado no comprimento de sua célula de cria. Células menores do que 1,5cm têm grande chance de pertencerem a um indivíduo macho, enquanto células maiores do que 2,2cm de pertencerem a uma fêmea. Dessa forma, com essa técnica é possível estimar o sexo de alguns indivíduos que não se desenvolveram por completo e morreram antes de chegar à fase adulta e que, portanto, não permitiriam a sexagem direta.



**Figura 9)** Distribuição do comprimento das células de cria para cada sexo (n= 59 células de fêmeas; n= 87 células de machos). Foram usados dois desvios padrão, pois a distribuição demonstra 95% das amostras de cada sexo e minimiza a chance de erro na inferência do sexo baseado no comprimento da célula de cria.

Os dados da bionomia de *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Brockmann & Grafen 1989), *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (Brockmann 1992), *Trypoxylon (Trypargilum) antropovi* (Camillo 1999) e *Trypoxylon (Trypargilum) aestivale* (Camillo 1999) são apresentados na Tabela 2, juntamente com os nossos dados de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, para fins comparativos. Ao que esses dados indicam, *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* é menor do que as outras espécies (vide comprimento da célula de cria), enquanto *Trypoxylon (Trypargilum) politum* é a maior. *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* também é a que



nidifica mais células de cria por tubo, apesar de que cada célula de cria é feita independentemente. Como para as outras espécies o tubo é primeiramente construído e só depois é provisionado, as fêmeas nidificadoras realizam o esforço de completar o tubo já construído com células de cria para só depois construírem outro tubo. Como a construção dos mesmos ocorre tanto ao lado dos já existentes, como em algum lugar distante, isso pode ser um indicativo de que há alguma estratégia de dispersão da prole (com poucos tubos de barro por ninho), ou de mantê-la agregada no mesmo local (muitos tubos de barro por ninho, ou estender os tubos de barro já existentes). Se considerado cada tubo (célula no caso de *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae*) como um evento independente.

**Tabela 2)** Bionomia comparada de espécies do grupo *Albitarse* (média/±desvio padrão).

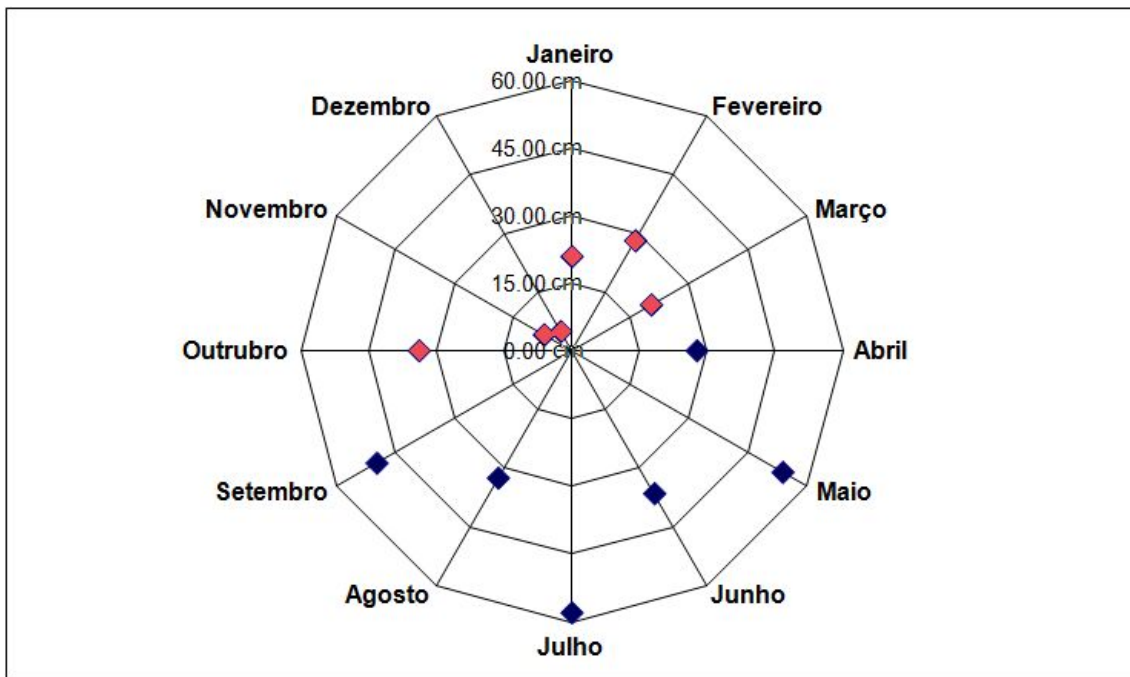
	Espécies				
	<i>T. albitarse</i>	<i>T. antropovi</i> <sup>a</sup>	<i>T. aestivale</i> <sup>a</sup>	<i>T. politum</i> <sup>b</sup>	<i>T. monteverdeae</i> <sup>c</sup>
tubos por ninho	1,86 ±1,28DP	3,80 ±2,4DP	2,80 ±0,97DP	-	3,20 ±0,43DP
células por tubo	3,68 ±2,63DP	4,0 ±1,1DP	5,70 ±3,1DP	3,1	6,10 ±0,37DP
comprimento do tubo	12,30cm ±6,99DP	9,30cm ±2,3DP	14cm ±5,0DP	8,9cm	11,10 cm ±0,75DP
diâmetro das células	0,95cm ±0,1DP	0,79cm ±0,6DP	-	1,1cm	0,55 cm ±0,008DP
comprimento das células	1,82cm ±0,23DP	1,70cm	-	2,1cm	1,30 cm ±0,02DP

<sup>a</sup>Camillo 1999; <sup>b</sup>Brockmann & Grafen 1989; <sup>c</sup>Brockmann 1992.

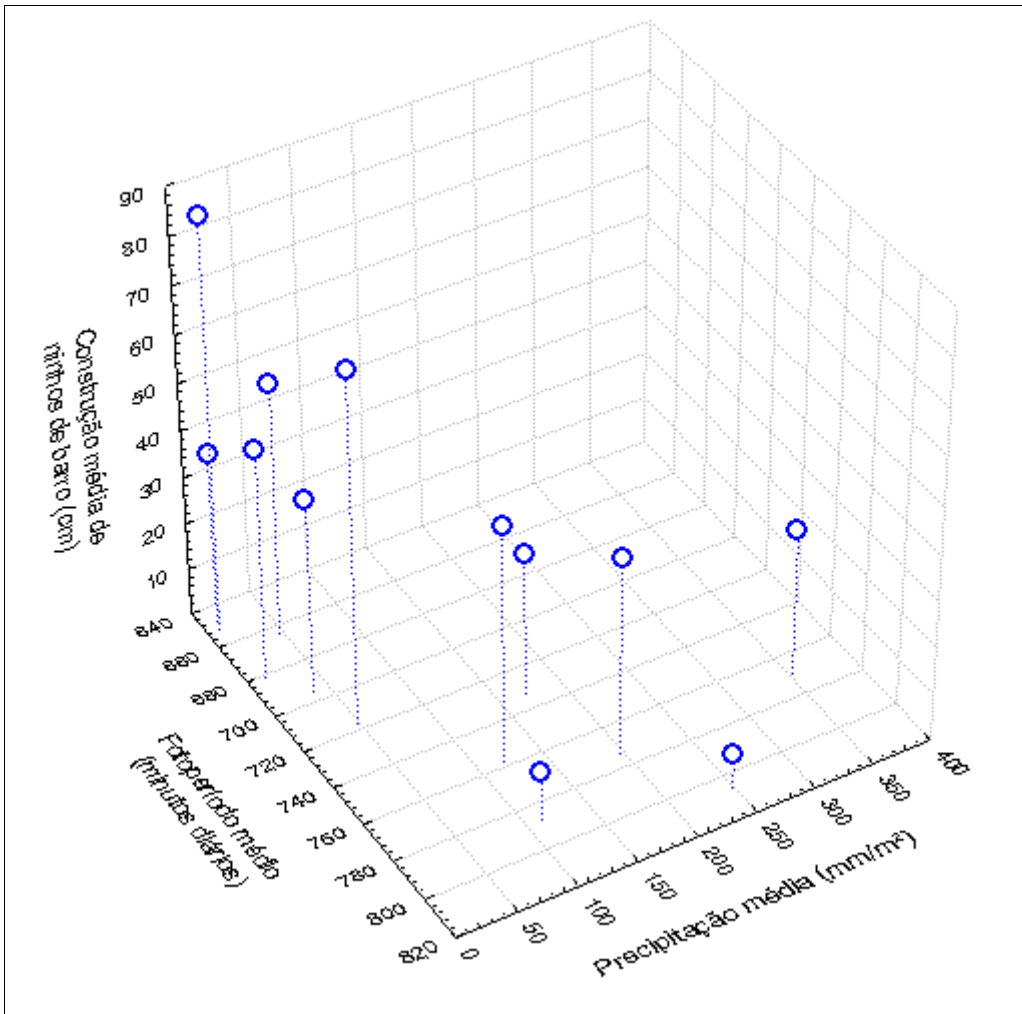
Fêmeas de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* mostraram preferência por nidificar ao lado de tubos já construídos a iniciar um tubo isolado (60,9% de 256 tubos em Amarante 1991 e 70% de 82 tubos neste trabalho), assim como *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (85% de 59 tubos) (Brockmann 1992). Não houve diferença estatística entre construir um tubo à esquerda ou à direita de um já construído ( $\chi^2= 3,648$ ;  $p= 0,0561$ ;  $n= 145$  tubos).

O tempo médio de construção de um tubo foi de um a quatro dias (1,5 dias ± 1,37 DP;  $n= 22$  tubos). Brockmann (1980) inferiu de um a dois dias para *Trypoxylon (Trypargilum)*

*politum*. Amarante (1991) detalha esse comportamento em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* ao afirmar que as fêmeas só permanecem na atividade de construção por um dia e que, no dia seguinte, ela começa a aprovisionar no que fora construído no dia anterior. Terminado o aprovisionamento, ela pode ou não estender aquele tubo ou construir outro ao lado deste. Provavelmente, é esse comportamento que predomina nas espécies que constroem tubos de barro. Os meses em que houve maior atividade de construção foram os referentes à estação seca e fria (Abril a Setembro) (Figura 10) a qual teve 2,25 mais atividade do que a estação úmida e quente (Outubro a Março). Usualmente, é esperada maior atividade de abelhas e vespas solitárias durante as estações mais quentes do ano (Camillo *et al.* 1993, Camillo *et al.* 1994, Camillo & Brescovit 1999, Loyola & Martins 2006, Santoni & Del Lama 2007); no entanto, *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* apresentou forte associação entre a atividade de construção e as características da estação seca e fria, como fotoperíodo, precipitação e temperatura (Figura 11). Apesar disso, como já dito anteriormente, as fêmeas não nidificam durante a noite, em dias nublados e nos períodos mais frios do dia. Na estação seca e fria, nos dias quentes e sem nuvens, principalmente nas horas mais quentes do dia, a atividade dessas fêmeas é muito mais intensa do que nas mesmas condições durante a estação úmida e quente. Este achado pode ser uma indicação da influência do microclima da região se sobrepondo à do macroclima e também que a maior atividade de construção nessa estação seja em função da primavera (Setembro e Outubro), época em que há maior número de emergências no ano (Figura 14).



**Figura 10)** Taxa de atividade de construção de tubos de barro (cm/mês) ao longo do ano em São Carlos (n= 129 tubos). Os meses em vermelho (Outubro a Março) se referem à estação úmida e quente, enquanto os meses em azul (Abril a Setembro) se referem à estação seca e fria.



**Figura 11)** Gráfico de correlação entre precipitação média (mm/m<sup>2</sup>) no eixo X, fotoperíodo médio (minutos diários) no eixo Z, e construção média de ninhos de barro (cm) no eixo Y (Multipl R z/xy= 07935; p= 0,0114). A precipitação média mensal e a temperatura média mensal (não está no gráfico) apresentaram alta correlação ( $r^2= 0,4529$ ;  $r= 0,6730$ ;  $p= 0,0165$ ), portanto ela não altera significativamente os resultados deste gráfico. Dados de precipitação foram obtidos no site "<http://www.cppse.embrapa.br/050pesquisa/bovinos-da-raca-canchim/origem>". Todos os dados são referentes à cidade de São Carlos.

### 3.3.3- Ciclo de vida

O tempo de desenvolvimento de um indivíduo foi considerado como a diferença entre a data do término do provisionamento do tubo a que pertencia e a data da sua emergência. Dessa maneira, foi possível estimá-lo tanto a partir dos indivíduos coletados e levados para o laboratório, quanto daqueles que permaneceram em suas células de cria. Para esses últimos, a data de emergência foi estipulada quando era visualizado o orifício de emergência do

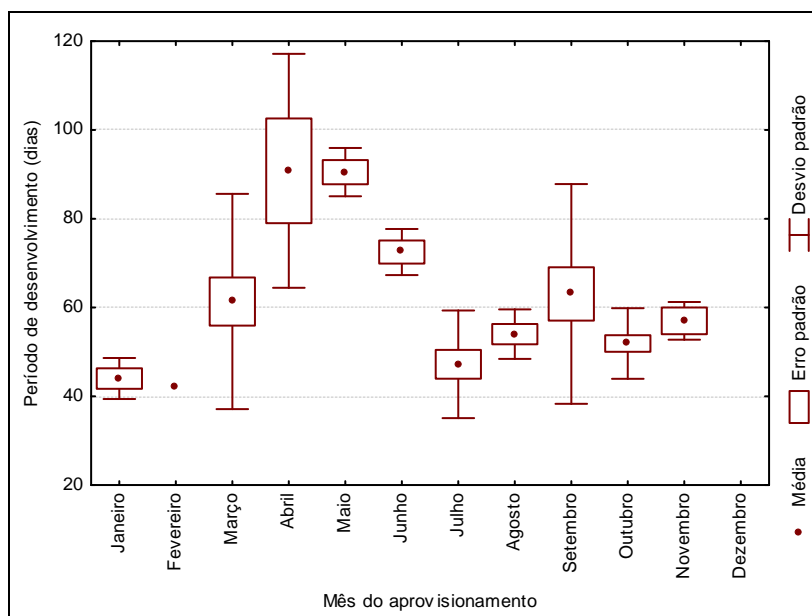
indivíduo no tubo de barro (Figura 12). Não foi encontrada diferença no tempo de desenvolvimento entre os indivíduos coletados e levados ao laboratório e os deixados nas células de cria no campo (Kruskal-Wallis, KW= 0,23911; p= 0,5317; Laboratório: 50,11 dias  $\pm$  12,65 DP; n= 22 indivíduos; Campo: 60,37 dias  $\pm$  21,08 DP; n=73 indivíduos); por esta razão, os dados foram agrupados.



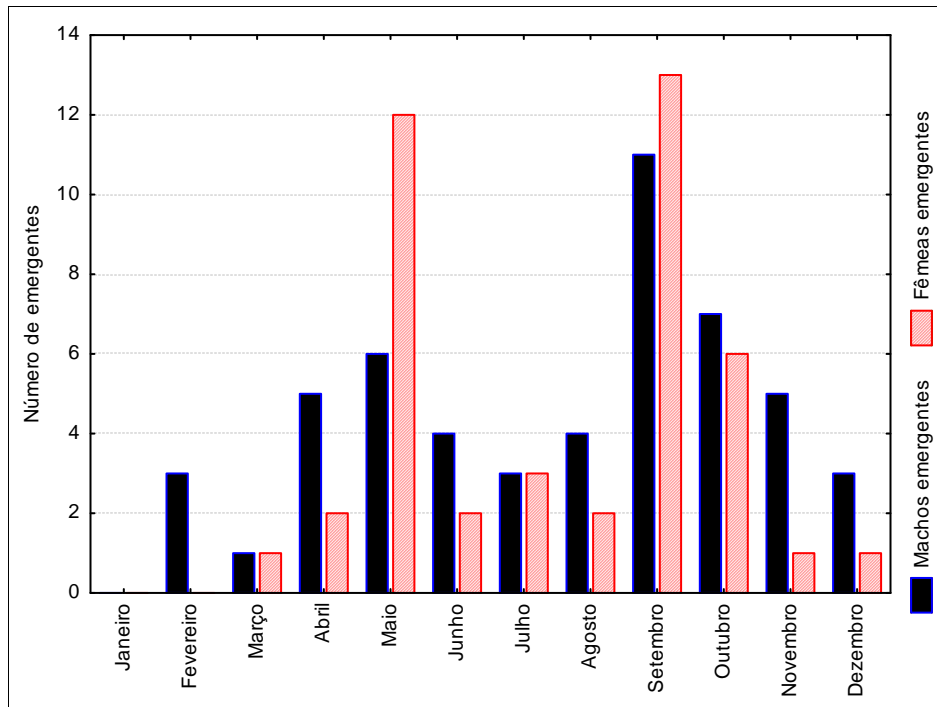
**Figura 12)** Ninho de *Trypoxylon albitarse* constituído por 11 tubos de barro. Esses orifícios, escavados pelos adultos recém emergidos, permitem estipular com precisão em qual célula de cria houve a emergência e a sua data. (Foto: Juliano Almeida)

Entre as cidades de São Carlos e Araras houve diferença no tempo de desenvolvimento (Kruskal-Wallis, KW= 5,1713; p= 0,0230; São Carlos: 74,17 dias  $\pm$  61,47 DP; n= 245 indivíduos; Araras: 50,54 dias  $\pm$  38,05 DP; n= 97 indivíduos); no entanto, isso pode ser reflexo da falta de coletas ao longo de todo o ano na cidade de Araras (coletas ocorreram de Março a Agosto de 2007). Assim, em São Carlos foi possível observar a distribuição do tempo de desenvolvimento e de emergentes ao longo do ano (Figura 13 e Figura 14). Percebe-se que antes da estação

seca e fria (de Abril a Setembro), e em seu início, há o aumento do tempo de desenvolvimento, inclusive tendo o seu ápice em Maio com um desvio-padrão menor em relação aos meses anteriores, mostrando que todos os indivíduos desse mês estão passando por quiescência. Esse padrão de pré-inverno também foi observado por Amarante (1991) para essa mesma espécie e por Brockmann & Grafen (1989) para *Trypoxylon (Trypargilum) politum*, porém, nessa última espécie, os indivíduos entraram em estado de diapausa durante o inverno. Neste trabalho e para essa estação, foi observado emergências, apesar destas se destacar nas fases pré e pós-inverno, fato que também foi observado por Amarante (1991). Essa tendência do aumento da amplitude do tempo de desenvolvimento conforme se aproxima o inverno, permitindo a emergência de alguns adultos durante o mesmo, reforça a idéia de que essas vespas tenham alta atividade de nidificação durante a estação seca e fria, pelo menos nessa região. Este resultado é distinto do observado para *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Brockmann & Grafen 1989) na Flórida, EUA.



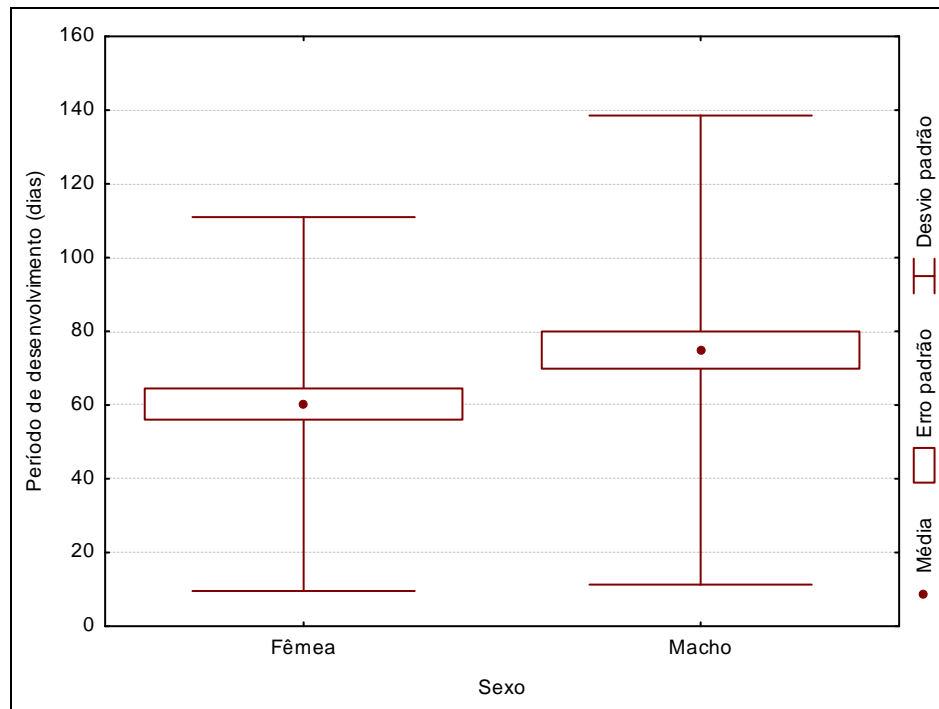
**Figura 13)** Tempo de desenvolvimento (em dias) ao longo do ano em São Carlos (n= 95 indivíduos).



**Figura 14)** Distribuição dos emergentes ao longo do ano em São Carlos. Os meses de Abril a Setembro correspondem à estação fria e seca; entre Outubro e Março, a estação quente e úmida (n= 95 indivíduos).

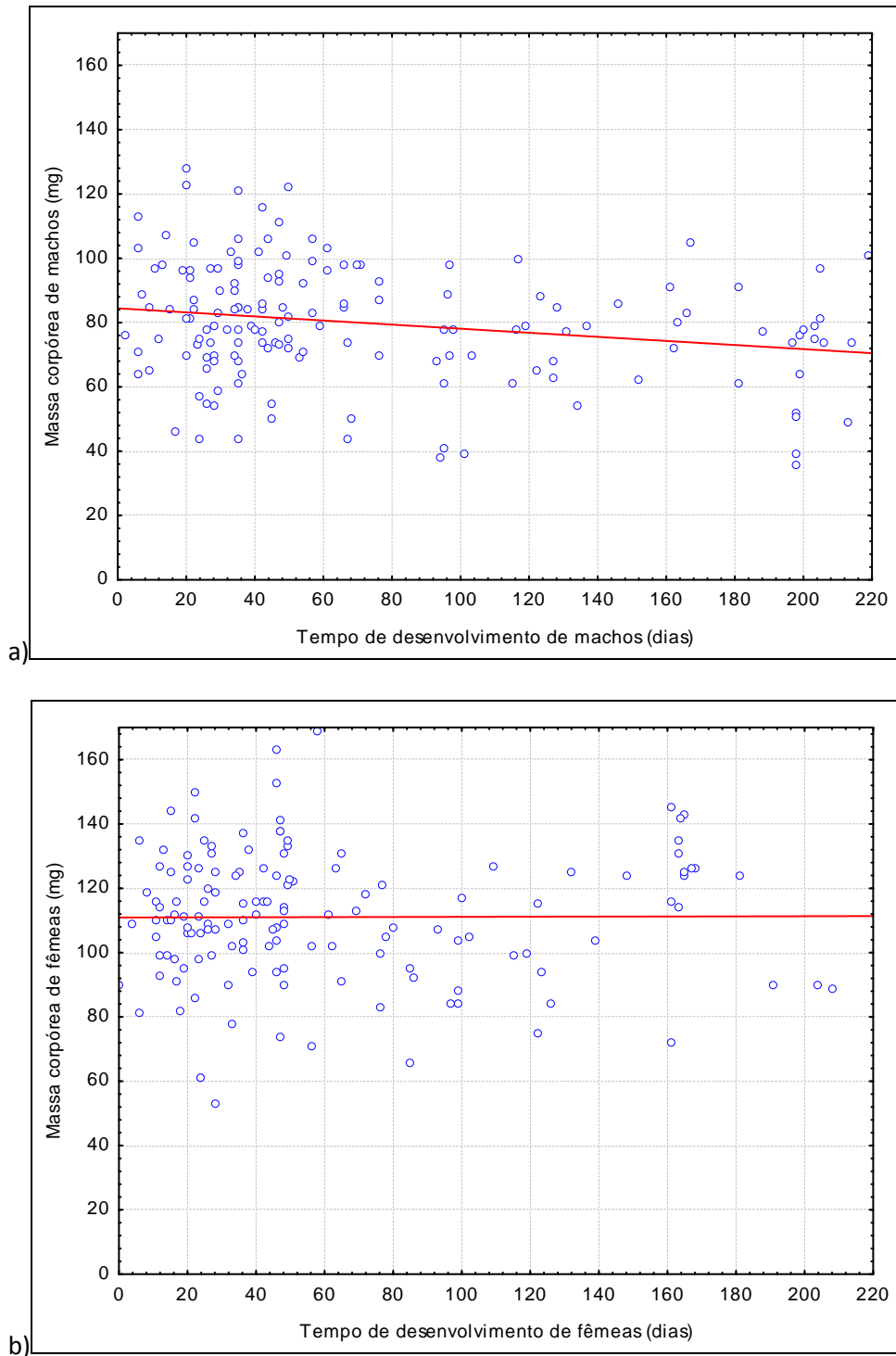
Como a alimentação da cria desses crabronídeos é massal, é esperado que quanto maior o tempo de desenvolvimento do indivíduo, menor a sua massa corpórea ao emergir. Isso porque parte da energia do alimento que deveria se transformar em massa corporal é usada na manutenção do corpo durante o tempo de desenvolvimento prolongado. Neste trabalho foi observado que há diferença entre os tempos de desenvolvimento de machos e fêmeas (teste-t= 4,8495;  $p= 0,0284$ ; Machos: 74,92 dias  $\pm$  63,61 DP; n= 159 indivíduos; Fêmeas: 60,26 dias  $\pm$  50,71 DP; n= 144 indivíduos) (Figura 15) e que nos machos a massa corpórea tende a diminuir de acordo com o aumento do tempo de desenvolvimento, conforme esperado ( $r^2= 0,0487$ ;  $r= -0,2207$ ;  $p= 0,0052$ ; n= 84 machos) (Figura 16a). No entanto, o mesmo não aconteceu com as fêmeas. Para elas, independentemente do tempo que ficam em desenvolvimento, a sua massa corpórea não é alterada em média ( $r^2= 0,0000$ ;  $r= 0,0049$ ;  $p= 0,9535$ ; n= 77 fêmeas) (Figura 16b) além de também apresentarem menor desvio

padrão em relação aos machos (Figura 15). Isso talvez ocorra devido à pressão de seleção sobre o seu tamanho corpóreo, já que este afeta a caça e o transporte das aranhas durante a nidificação. Assim, deve haver algum mecanismo que não as permita perderem massa corpórea por mais que tenham um tempo de desenvolvimento mais prolongado.



**Figura 15)** Tempo de desenvolvimento de fêmeas (n= 144) e machos (n= 159).



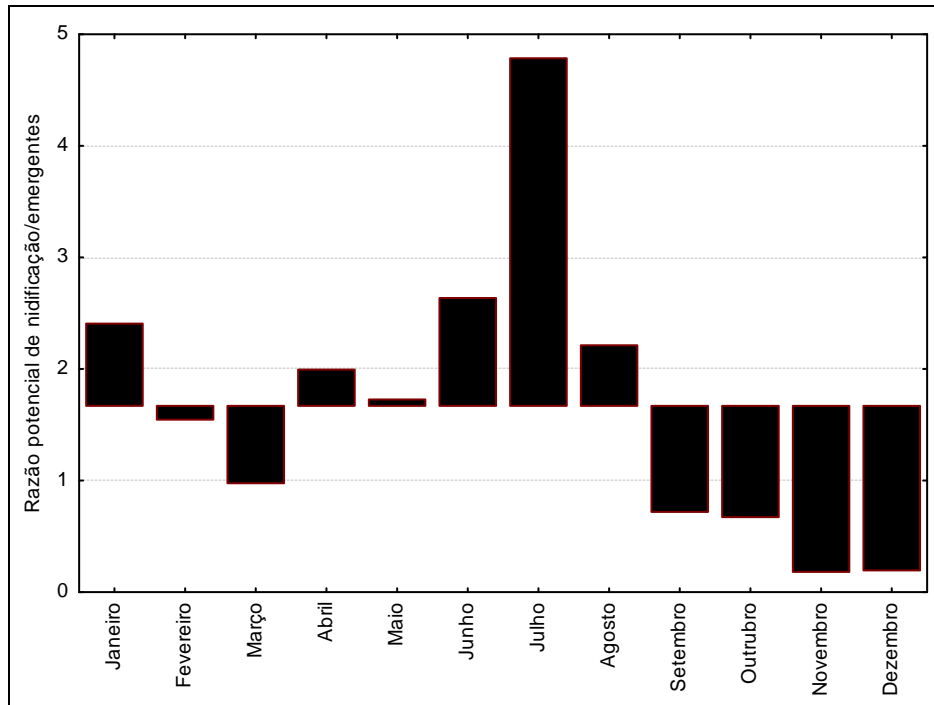


**Figura 16)** Correlação entre massa corpórea e tempo de desenvolvimento de machos (a) e fêmeas (b) (n= 159 machos e 144 fêmeas).

Com o intuito de compreender melhor como se comporta o ciclo de vida de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* em São Carlos, buscou-se estimar a razão “potencial mensal de nidificação/emergentes”. Entender como ocorre o investimento médio das fêmeas de uma

população permite visualizar o momento pelo qual a população está passando, o que facilitaria a comparação de diferentes populações ou espécies, ou mesmo o delineamento de projetos. Para isso é necessário medir e somar o investimento das fêmeas em cada mês. Para tal, foram utilizados o comprimento dos tubos de barro aprovionados e o tamanho médio de uma célula de cria (1,82 cm). A visualização dos resultados desse investimento foi direta, pois consistiu na observação da emergência dos adultos que deixam um orifício no tubo por onde saem (Figura 12). Essas variáveis foram escolhidas para a mensuração do 'potencial mensal de nidificação' por serem amostragens indiretas e, portanto, por não interferirem na população. Fazendo a razão do investimento mensal pelo número de emergentes de cada mês e comparando com o valor médio anual, essa razão se comporta como um indicativo da tendência daquela população a cada mês (Figura 17). Por exemplo, entre os meses de Setembro e Dezembro (primavera e início de verão), houve predomínio da emergência de indivíduos em relação à nidificação. Por outro lado, entre os meses de Junho e Agosto (inverno), a tendência da população estava concentrada na nidificação. Esse panorama permitiu comparar o comportamento dessa população com uma outra (Amarante 1991), assim como com de outra espécie (*Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Brockmann & Grafen 1992)). Amarante (1991) separou a atividade de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* em duas estações de nidificação, aparentemente uma no verão e outra no outono, sendo que durante o inverno (Julho e Agosto) não foram encontrados adultos em atividade e as larvas estavam em quiescência. Brockmann & Grafen (1992) apresentaram informações mais precisas quando identificaram duas gerações ao ano, sendo a primeira no início da primavera e a segunda no meio do verão. Eles também observaram que não havia atividade de adultos durante o outono e o inverno, o que é compreensível, pelo fato do estudo ter se desenvolvido no estado da Flórida (EUA), onde o inverno é mais rigoroso do que no sudeste do Brasil. Sendo assim, os dados denotam que, apesar de haver diferentes momentos de atividade de nidificação entre populações e espécies, há uma tendência de ocorrer tempo de desenvolvimento mais

prolongado durante o inverno e que há épocas do ano mais propensas à nidificação, assim como outras para a emergência de adultos.



**Figura 17)** Razão entre o ‘potencial mensal de nidificação’ e emergência com os dados de São Carlos. O eixo X cruza com o eixo Y no valor da razão média do ano (1,67), assim é possível observar com maior destaque o momento pelo qual a população passa a cada mês.

O valor médio dessa razão no ano foi de 1,67, ou seja, por esse estimador, houve uma tendência de ocorrer um investimento 67% maior em nidificações do que em emergências, o que seria esperado, supondo uma população estável e tendo em vista a ocorrência de parasitismo, problemas durante o desenvolvimento, predação e outros fatores que levam à mortalidade precoce dos indivíduos. Assim, considerando essa população estável, seria de se esperar que a mortalidade total fosse por volta de 67%. No entanto, como só houve acompanhamento de uma parte da vida dos indivíduos, do ovo até a emergência dos adultos, essa porcentagem será usada de maneira especulativa.

As causas de mortalidade foram divididas em duas categorias: parasitismo e problemas no desenvolvimento. Respectivamente, foram considerados como a emergência de um

parasitóide da célula de cria, assim como a observação de um indício de parasitismo nos tubos de barro no campo, e a não emergência de um adulto.

Dos ninhos obtidos na cidade de Araras, foram coletados 255 casulos, dos quais 20,4% deles apresentaram problemas no desenvolvimento e 2,7% foram parasitados, sendo três por *Melittobia sp* (Eulophidae), dois por Chalcididae e dois por espécies não identificadas. Na cidade de São Carlos, foi possível obter dados tanto dos casulos coletados, quanto das células de cria acompanhadas a campo. Dessa forma, foram coletados 239 casulos, dos quais 15,5% apresentaram problemas no desenvolvimento e 13,4% deles foram parasitados, sendo 20 por *Melittobia sp* (Eulophidae), oito por Chalcididae (*Brachymeria villosa* Oliver 1790), um por Ichneumonidae e um por espécie não identificada. A campo, foram observadas 242 células de cria, das quais 17,4% apresentaram problemas no desenvolvimento e 4,5% foram parasitadas, seis por *Melittobia sp* (Eulophidae), dois por Chalcididae (*Brachymeria villosa*) e três por Ichneumonidae (Tabela 3). Para São Carlos, não houve diferença significativa de mortes por problemas no desenvolvimento entre os indivíduos coletados e os mantidos em campo ( $\chi^2=0,316$ ;  $p=0,5737$ ). O grande índice de mortalidade devido a *Melittobia sp* (Eulophidae) no laboratório provavelmente foi causado por dispersão dessas entre os tubos de plásticos. Como explicação alternativa, podemos supor também que no campo, quando uma célula de cria estava parasitada, geralmente as outras do mesmo ninho também estavam, e assim, com a coleta dessas, parte da população do parasitóide foi levada para o laboratório, diminuindo a sua dispersão no campo. Todavia, as duas suposições podem ter ocorrido de formas não excludentes. *Melittobia sp* também foi reportada como o principal parasitóide de ninhos por Camillo *et al.* (1994), Camillo (1999), Loyola & Martins (2006) e Santoni & Del Lama (2007).

**Tabela 3)** Comparativo de mortalidade entre Araras e São Carlos e entre laboratório e campo da cidade de São Carlos.

	Araras	São Carlos	
		Laboratório	Campo
Pupários coletados	255	239	242
Problemas no desenvolvimento	20,4%	15,5%	17,4%
Parasitóides	2,7% <sup>a</sup>	13,4% <sup>b</sup>	4,5% <sup>c</sup>

<sup>a</sup>três *Melittobia sp* (Eulophidae), dois Chalcididae e dois desconhecidos; <sup>b</sup>20 *Melittobia sp* (Eulophidae), oito Chalcididae (*Brachymeria villosa*), um Ichneumonidae e um desconhecido; <sup>c</sup> seis *Melittobia sp* (Eulophidae), dois Chalcididae (*Brachymeria villosa*) e três Ichneumonidae.

Amarante (1991) encontrou parasitismo em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* pela espécie *Brachymeria mexicana* (Chalcididae), e outras famílias, como *Photocryptos sp* (Ichneumonidae) e *Chrysis sp* (Chrysididae). Ele observou também mortalidade de 27,4% por problemas no desenvolvimento, que, por sinal, considerou baixa. Parasitóides dessas últimas duas famílias também foram encontrados em Garcia & Adis (1995), Buschini & Wolf (2006) e Santoni & Del Lama (2007). Brockmann & Grafen (1989) encontraram principalmente Chrysididae e *Melittobia sp* (Eulophidae); Brockmann (1992) contabilizou em sua maioria Ichneumonidae e Sarcophagidae (Diptera); Coville & Coville (1980), além dessas duas últimas famílias, também encontraram Chrysididae, e Freeman (1981) contabilizou principalmente parasitóides das famílias Ichneumonidae e Chalcididae.

Foi observada a campo uma fêmea de *Brachymeria villosa* parasitando quatro células de cria (Figura 18). A fêmea escavou o barro do tubo usando as peças bucais, abriu um orifício e por este ovipositou. Também foi observada uma fêmea escavando o tubo enquanto o macho-guarda estava presente, mas esse não conseguiu expulsá-la (Figura 19). Os pupários dessas células de cria atacadas foram levados ao laboratório a fim de confirmar o parasitismo e identificar a espécie do parasitóide.



**Figura 18)** Fêmea de *Brachymeria villosa* (Chalcididae) escavando um tubo de barro e ovipositando em seguida. Os orifícios da primeira imagem são células já parasitadas por essa fêmea. (Fotos: Juliano Almeida)



**Figura 19)** O Macho de *Trypoxylon albitarse* não saiu do ninho para expulsar o parasitóide (*Brachymeria villosa* – Hymenoptera: Chalcididae). Ele ficou zumbindo o tempo todo, porém não saiu do ninho, permanecendo postado na entrada do tubo de barro. (Foto: Juliano Almeida)

Considerando as células de cria coletadas e as acompanhadas a campo, a mortalidade total estimada, do ovo à emergência do adulto na cidade de São Carlos, foi de 25,36%. Assim, e supondo constante o tamanho da população, espera-se que a mortalidade total dos indivíduos na fase adulta seja de 41,64%, podendo essa ser consequência de diversos fatores, como doenças, ataques de fungos, predação por outras espécies e morte natural.

No intuito de encontrar algum fator que estivesse associado à mortalidade dos ninhos, foram realizadas análises de correlação entre a mortalidade de cada ninho e o número de emergentes sobre o total de células de cria provisionadas de cada ninho. Da mesma maneira entre a mortalidade de cada ninho com a razão de alocação de recursos para fêmeas sobre o total alocado ( $r^2= 0,0261$ ;  $r= -0,1616$ ;  $p= 0,3851$ ), a razão sexual de machos sobre o total de indivíduos emergidos ( $r^2= 0,0529$ ;  $r= -0,2301$ ;  $p= 0,2052$ ) e com a quantidade de células de cria por ninho ( $r^2= 0,0001$ ;  $r= 0,0073$ ;  $p= 0,9684$ ). No entanto, para nenhum destes testes houve correlação significativa, sugerindo que não há evidências de associação entre a mortalidade verificada nos ninhos e esses fatores.

#### **3.3.4- Investimento parental**

A razão sexual secundária pode ser medida tanto em São Carlos como em Araras. Em ambas as cidades, a proporção 1:1 de machos e fêmeas emergentes seguiu o proposto por Fisher (1930) (São Carlos:  $\chi^2= 0,004$ ;  $p= 0,9526$ ; Araras:  $\chi^2= 0,248$ ;  $p= 0,6188$ ). Não foi encontrada diferença na razão sexual secundária entre as duas cidades ( $p= 0,9519$ ). Amarante (1991) e Peruquetti (2003) também observaram razão sexual de 1:1 para *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse*, assim como Camillo (1999), Brockmann & Grafen (1989) e Brockmann (1992) observaram o mesmo para *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *antropovi*, *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *aestivale*, *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *politum* e *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *monteverdeae*, respectivamente. Embora estes trabalhos com espécies do grupo *Albitarse*

tenham encontrado produção igualitária dos sexos, a razão sexual pode flutuar de acordo com variações temporais e espaciais de cada população, principalmente no caso dos himenópteros em que a fêmea tem a capacidade de influenciar o sexo da prole de acordo com as condições ambientais e, por conseguinte, enviesar a razão sexual para o sexo que lhe render maior vantagem naquele momento (Trivers & Hare 1976, Charnov 1982). Na tentativa de encontrar correlação entre o investimento materno no sexo da prole e o tamanho do ninho foi feita uma análise entre a razão sexual de cada ninho e a sua quantidade de células de cria. No entanto, nenhuma associação foi encontrada, tanto em São Carlos ( $r^2= 0,0020$ ;  $r= -0,0447$ ;  $p= 0,8435$ ), como em Araras ( $r^2= 0,0863$ ;  $r= -0,2937$ ;  $p= 0,3541$ ).

Brockmann & Grafen (1992) mostraram desvios da razão 1:1 para uma população de *Trypoxylon (Trypargilum) politum* em função do inverno, época em que as larvas entram em diapausa. Eles notaram que há basicamente duas gerações por ano, uma geração pré-inverno, na qual a razão sexual é desviada a favor dos machos e o tempo de desenvolvimento é prolongado e uma geração pós-inverno, com razão 1:1 e desenvolvimento direto. Alguns machos que emergem na primeira geração sobrevivem ao inverno e se acasalam com as fêmeas da segunda geração, o que justifica talvez a maior proporção de machos na geração pré-inverno. Neste trabalho, o ano foi dividido em duas estações, fria e seca, e quente e úmida, e elas apresentaram entre si uma diferença que merece ressalva. A razão sexual na primeira foi de 0,97M:1F ( $\chi^2= 0,015$ ;  $p= 0,928$ ), o que não difere estatisticamente de 1:1. Contudo, na segunda estação, a razão sexual foi de 2,11M:1F, razão esta que, apesar de não ser estatisticamente diferente de 1:1, o valor de P é muito próximo do nível de significância assumido ( $\chi^2= 3,571$ ;  $p= 0,0588$ ). Assim, como no trabalho de Brockmann & Grafen (1992), neste trabalho se observou uma estação com proporções iguais entre os sexos e outra com predominância de machos, embora na estação quente e úmida a quantidade de emergentes seja muito menor do que na estação fria e seca (Figura 14).



Coville (1982) afirma que a sequência dos sexos dos ovos ovipositados em um ninho pode estar relacionada à defesa contra parasitóides. Espécies que nidificam em cavidades pré-existentes geralmente apresentam preferência por algum dos sexos nas células de cria mais internas, ou nas mais externas (Coville & Coville 1980; Camillo *et al.* 1993; Camillo *et al.* 1994; Garcia & Adis 1995; Oku & Nishida 1999; Tormos *et al.* 2005, Buschini & Wolf 2006; Santoni & Del Lama 2007), e é sabido que há exposição diferencial das mesmas para os parasitóides. Já para as espécies construtoras de ninhos expostos, como os crabronídeos do grupo *Albitarse*, nas quais as células de cria estão semelhantemente expostas aos parasitóides, é esperado que não haja essa preferência, como visto nas populações de São Carlos e Araras para *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Tabela 4 e Tabela 5). Brockmann & Grafen (1989) para *Trypoxylon (Trypargilum) politum* e Brockmann (1992) para *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* também não observaram essa preferência.

**Tabela 4)** Sequência dos sexos ovipositados nos ninhos de São Carlos.

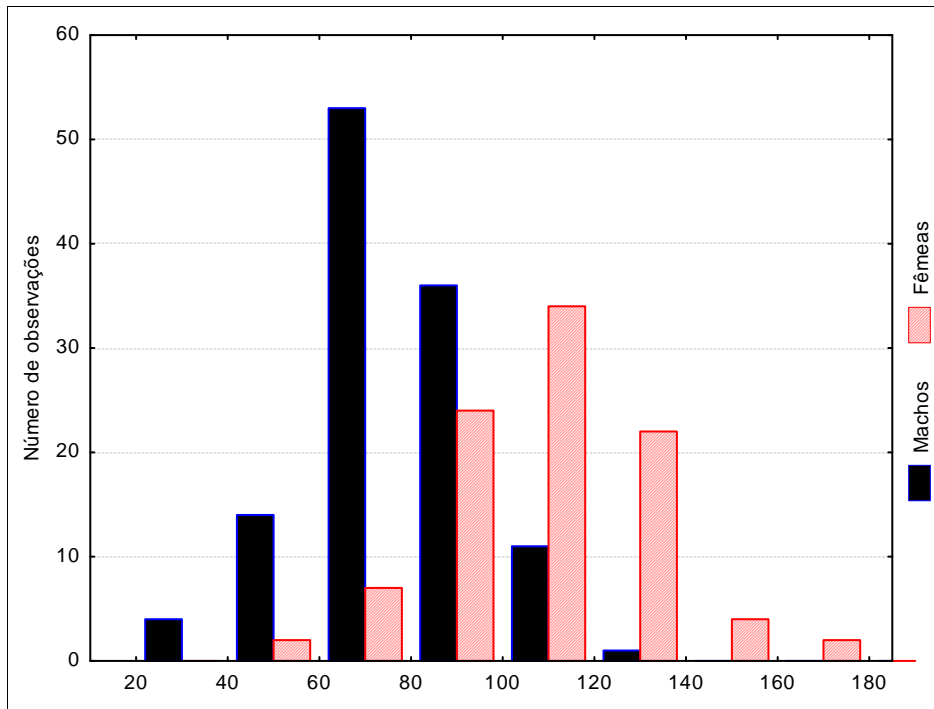
<b>Posição da célula de cria</b>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>P</b>
<b>1</b>	37	32	0,5472
<b>2</b>	39	35	0,6419
<b>3</b>	34	28	0,4461
<b>4</b>	22	30	0,2673

**Tabela 5)** Sequência dos sexos ovipositados nos ninhos de Araras.

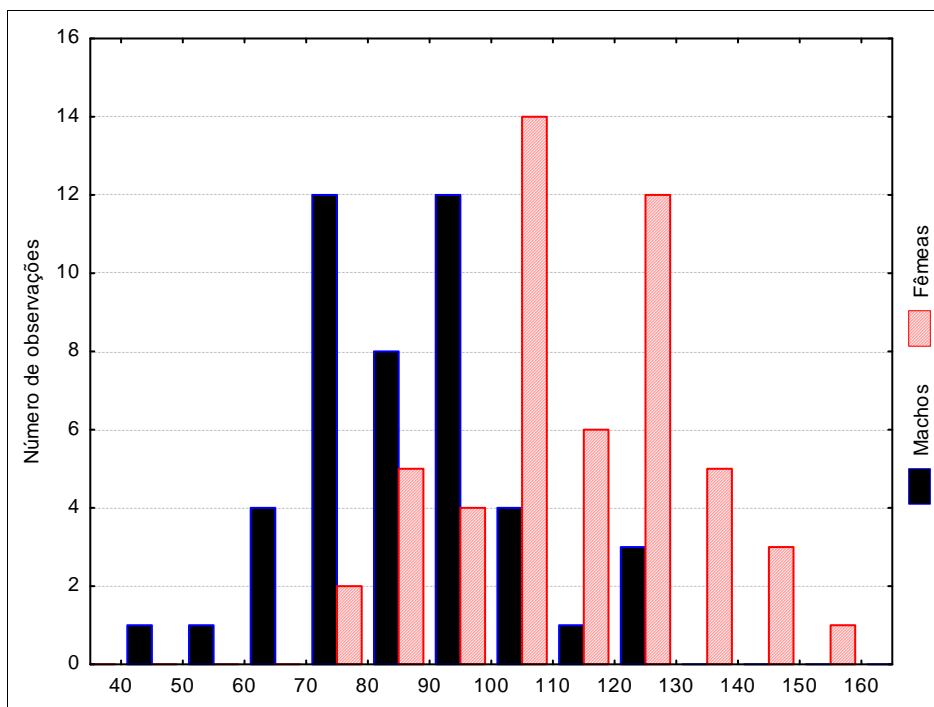
<b>Posição da célula de cria</b>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>P</b>
<b>1</b>	23	26	0,668
<b>2</b>	17	19	0,738
<b>3</b>	17	12	0,353
<b>4</b>	10	12	0,669

Referente à massa corpórea dos emergentes de São Carlos, o peso médio dos machos foi de 78,81 mg ( $\pm$  8,80 DP; n= 142 indivíduos) e o das fêmeas 108,40 mg ( $\pm$  14,71 DP; n= 141

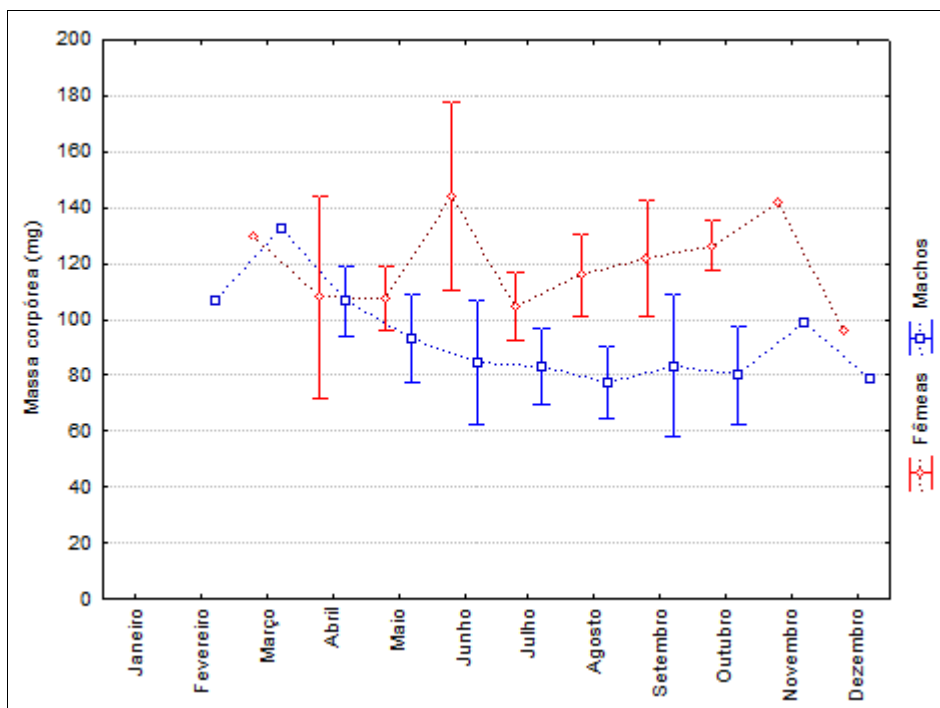
indivíduos) (Figura 20), ou seja, elas foram 37,5% mais pesadas (teste t:  $F= 56,5844$ ;  $p < 0,01$ ). Em Araras, o peso médio dos machos foi de 87,72 mg ( $\pm 10,65$  DP;  $n= 48$  indivíduos) e o das fêmeas 113,02 mg ( $\pm 10,27$  DP;  $n= 53$  indivíduos) (Figura 21), sendo elas 28,8% mais pesadas (teste t:  $F= 35,1232$ ;  $p < 0,01$ ). Esses resultados confirmam o que se esperava para essa espécie, já que o tamanho tem forte efeito no valor adaptativo das fêmeas (Brockmann & Grafen 1992; Molumby 1996; Peruquetti & Del Lama 2003a) e também por este estar relacionado com a massa corpórea e com a quantidade de alimento aprovionada na célula de cria do indivíduo (Amarante 1991; Molumby 1996). Reforçando este achado, Brockmann & Grafen (1989), Molumby (1996) e Peruquetti & Del Lama (2003a) já haviam afirmado que fêmeas maiores aprovionam mais e mais rapidamente, enquanto que machos maiores não necessariamente se reproduzem mais. Comparando a massa corpórea entre os sexos das duas cidades, os machos apresentaram diferença de peso (teste t:  $F= 6,400$ ;  $p= 0,0171$ ) enquanto as fêmeas não (teste t:  $F= 0,901$ ;  $p= 0,3504$ ). Por haver menor pressão de seleção para tamanho de corpo do macho, é de se esperar que haja maior variação de seu tamanho, sendo este mais dependente do microambiente a que o indivíduo está sujeito. De forma que, além da diferença entre as cidades, os machos da população de São Carlos também apresentaram maior variação de peso ao longo do ano (machos: ANOVA:  $F= 2,723$ ;  $p= 0,012$ ) do que as fêmeas (fêmeas: ANOVA:  $F= 1,687$ ;  $p= 0,132$ ) (Figura 22).



**Figura 20)** Distribuição da massa corpórea dos emergentes de São Carlos (n= 214 indivíduos).



**Figura 21)** Distribuição da massa corpórea dos emergentes de Araras (n= 98 indivíduos).



**Figura 22)** Variação da massa corpórea de machos e fêmeas ao longo do ano na cidade de São Carlos (n= 94 indivíduos).

Como há diferença de massa corpórea entre machos e fêmeas é esperado desvios da razão sexual, supondo um investimento igualitário de recursos entre os sexos. Em São Carlos, a razão sexual esperada seria de 1,37M:1F e em Araras de 1,28M:1F; no entanto, não foram significativamente diferentes das razões observadas, 1,01M:1F para São Carlos ( $p= 0,2492$ ) e 0,91M:1F para Araras ( $p= 0,1969$ ). Não foi encontrado também diferença de massa entre os indivíduos emergidos na estação fria e seca, e na quente e úmida (machos: teste t:  $F= 0,0775$ ;  $p= 0,7870$ ; fêmeas: teste t:  $F= 0,2924$ ;  $p= 0,6034$ ).

O tamanho de uma célula de cria é um bom estimador do volume de presas que foi investido naquela célula (Molunby 1996). No caso das espécies que provisionam de maneira massal, essa quantidade tem associação com o tamanho e, por conseguinte, com o valor adaptativo do adulto (Brockmann & Grafen 1989; Molunby 1996). Esse estimador foi confirmado neste trabalho pela correlação positiva entre a massa corpórea dos emergentes com o comprimento de suas células de cria ( $r^2= 0,1571$ ;  $r= 0,3963$ ;  $p< 0,01$ ;  $n= 146$ ). Também foi feito teste de correlação entre a massa corpórea dos emergentes de um ninho com a

quantidade de células de cria dos mesmos. Em São Carlos não houve associação entre eles ( $r^2= 0,0522$ ;  $r= -0,2285$ ;  $p= 0,3468$ ;  $n= 22$ ), ao passo que em Araras, os ninhos com maior quantidade de células de cria geraram prole menor ( $r^2= 0,3381$ ;  $r= -0,5815$ ;  $p= 0,0474$ ), podendo, talvez ser um indicativo de que a fêmea nidificadora tenha a capacidade de perceber a abundância de presas no ambiente e ajustar o tamanho das suas células de cria de acordo com o mesmo (Charnov 1982).

Com o intuito de estimar a alocação de recursos, a massa corpórea média de cada sexo foi multiplicada pela razão sexual da população a que pertencia. Dessa forma, pode-se concluir que as fêmeas receberam maior quantidade de recursos do que os machos (São Carlos: 36,57%; teste t:  $F= 4,488$ ;  $p= 0,0341$ ; Araras: 42,38%; teste t:  $F= 5,861$ ;  $p= 0,0155$ ) e que entre as cidades não houve diferença significativa de recursos alocados para cada sexo (machos: teste t:  $F= 0,001$ ;  $p= 0,996$ ; fêmeas: teste t:  $F= 0,096$ ;  $p= 0,7562$ ), apesar de haver um potencial para essa diferenciação, partindo do pressuposto de que há diferenças entre os microclimas de cada região e a disponibilidade de aranhas para cada um dos locais. Em relação aos machos apresentarem maior amplitude de variação do que as fêmeas para algumas características, como na massa corpórea das populações, ao longo do ano e nos tempos do desenvolvimento, este achado reforça a suposição prévia - essas características apresentam pressão de seleção diferenciada entre os sexos, sendo maior nas fêmeas do que nos machos, por elas nidificarem, caçarem e conseqüentemente cuidarem da prole enquanto os machos não o fazem.

Uma maneira de estimar o efeito da pressão de seleção sobre um caráter de uma população é através da herdabilidade desse caráter. Este parâmetro mede quanto do valor fenotípico da prole regride ao valor fenotípico dos pais. A maneira mais adequada de obter o valor da herdabilidade, no caso da massa corpórea, seria por meio da correlação entre as massas das proles e a média da massa de seus pais. O valor da inclinação da reta da correlação formada corresponderia ao valor da herdabilidade (Falconer 1989). Contudo, como neste trabalho poucos casais foram coletados, a estimativa da herdabilidade por esse procedimento

não seria consistente. Sendo assim, ele foi calculado a partir do peso médio da cria de cada ninho em relação à média de toda a população, por meio do cálculo do coeficiente de correlação intraclasse (CCI) e a relação média de parentesco dentro de um ninho formado por um só pai e mãe (3/8). Assim, foi possível estimar a herdabilidade do peso nas populações das duas cidades. Em São Carlos, a herdabilidade calculada foi de 0,4456 (CCI= 0,1671; p= 0,0065), o que corresponde a dizer que 44,56% da variação do peso da prole é devida à variância genética; em Araras, o valor obtido foi de 0,3274 (CCI= 0,1228; p= 0,0258). Vale lembrar que a herdabilidade estimada não é válida para uma espécie e sim para a população em um certo instante, já que ela está ligada à variação genética e à pressão de seleção sobre o caráter, fatores que variam no espaço e no tempo (Falconer 1989).

O acompanhamento de mais casais, com suas respectivas proles, é necessário não só para obter uma estimativa mais acurada da herdabilidade, como também para aumentar as evidências de que a massa corporal das fêmeas está sob maior pressão de seleção do que a dos machos. A marcação de indivíduos adultos nidificantes também dará robustez às informações em relação a todo o processo de nidificação, assim como, essa atividade ser mais intensa na estação fria e seca e a assincronia entre a nidificação e a emergência dos adultos. Por conseguinte, também melhorará o entendimento da ocorrência de quiescência nessa espécie, apesar dela aparentar ser multivoltina no sudeste brasileiro. Dessa forma, a biologia de nidificação de *Trypoxylon* e, mais especificamente, das espécies que constroem seus próprios ninhos, como *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, poderá ser melhor conhecida.

#### **4- CAPÍTULO 2: “Marcadores microssatélites para a espécie *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)”**

Vespas crabronídeas do gênero *Trypoxylon* se caracterizam por apresentarem fêmeas solitárias que provisionam seus ninhos de forma massal com aranhas paralisadas, as quais servirão de alimento para as suas larvas. Elas nidificam em cavidades pré-existentes, ou em ninhos de barro em forma de tubos, que são constituídos por células de cria linearmente dispostas. Diferentemente da maioria dos machos de himenópteros, machos do subgênero *Trypargilum* se caracterizam por auxiliar a fêmea durante o processo de nidificação (Brockmann 1980). Eles atuam como guarda, permanecendo no ninho expulsando parasitóides e outros machos que se aproximam. Dessa forma, eles têm chance de conseguir cópulas repetidas durante o provisionamento. Há relatos de que em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* e outras espécies desse subgênero, a fêmea copula com outros machos além do macho-guarda (Coville & Coville 1980, Brockmann & Grafen 1989, Amarante 1991, Brockmann 1992) e, de maneira geral, este último não reage a essas cópulas extra-par da fêmea. Assim, a fim de se compreender melhor esses comportamentos, questões referentes à garantia da paternidade da prole pelo macho-guarda e do sistema de acasalamento neste grupo carecem de análises genéticas.

O parentesco médio em ninhos de *Trypoxylon* foi estimado por Peruquetti (2003) e Santoni (2008) utilizando marcadores alozímicos; porém, devido ao baixo polimorfismo do marcador, a paternidade das crias só pode ser associada ao macho-guarda em alguns ninhos. Queller *et al.* (1993), Pederson & Boomsma (1999) e Hughes (1998) afirmam que o uso de regiões de microssatélites é mais adequado para estimar o número de machos que fertilizaram os óvulos de uma fêmea e inferir a paternidade de uma prole. Para as espécies da família Crabronidae, atualmente só foram descritos marcadores microssatélites para *Philanthus triangulum* (Kantenpoth *et al.* 2004) e *Microstigmus nigrophthalmus* (Lucas *et al.* 2009),

demonstrando a necessidade de marcadores específicos para esse grupo. Sendo assim, neste capítulo há a descrição da prospecção e dos testes dos marcadores microssatélites para *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*.

O DNA foi extraído a partir do mesossoma de adultos usando modificações do protocolo de fenol-clorofórmio de Fernandes-Salomão *et al.* (2005). A estratégia adotada para o isolamento das sequências de microssatélites foi a construção de uma biblioteca genômica enriquecida, proposta por Hamilton *et al.* (1999). O protocolo iniciou-se com a clivagem de aproximadamente 4µg de DNA com as enzimas de restrição *RsaI* e *BstUI* (*New England Biolabs Inc.*), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos da clivagem foram separados em gel de agarose 0,8%, o qual foi cortado na região correspondente ao intervalo dos produtos entre 300 e 1000pb. O DNA clivado foi eluído do gel com o kit *Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System* (Promega) e ligado a oligonucleotídeos fosfatados de dupla fita (*linkers*), com o objetivo de criar sítios de ligação de *primers* para as reações de PCR subsequentes. Para verificar a eficiência da reação, uma PCR foi realizada utilizando-se um par de *primers* complementar à sequência dos *linkers*.

A seguir, os fragmentos foram hibridizados com um conjunto de oito sondas biotinizadas de sequências repetitivas para motivos tetranucleotídicos: (AAAC)<sub>6</sub> - (AAAG)<sub>6</sub> - (AATC)<sub>6</sub> - (AATG)<sub>6</sub> - (ACCT)<sub>6</sub> - (ACAG)<sub>6</sub> - (ACTC)<sub>6</sub> - (ACTG)<sub>6</sub>. Os fragmentos hibridizados foram capturados utilizando partículas magnéticas ligadas à Streptavidina (*Streptavidin Magnosphere Paramagnetic Particles* - Promega), e o DNA restante, enriquecido com as sondas, foi amplificado por PCR. O produto foi clonado utilizando-se o kit *pGEM-T Vector Systems* (Promega), sendo as bactérias competentes preparadas com CaCl<sub>2</sub> e transformadas pela inoculação do vetor. Colônias foram plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina na concentração 100µg/ml de meio. Cerca de 15 minutos antes da transferência das bactérias, 40µl de X-Gal 2% e 100µl de IPTG 2,3% foram espalhados sobre o meio para seleção de recombinantes por coloração branca-azul.



As colônias recombinantes foram novamente plaqueadas em *MegaTiter plate* de 96 orifícios contendo 1ml de meio LB líquido com ampicilina, e incubadas por, aproximadamente, 22 horas a 37°C sob agitação. Foram feitas mini-preps com as colônias e essas foram utilizadas como molde para amplificação por PCR, visando identificar o tamanho dos insertos clonados. A reação de sequenciamento foi realizada com o kit *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), utilizando-se o sequenciador Megabace Flexyble 1000 (Ge HealthCare). Os eletroferogramas gerados foram visualizados com o programa Chromas 2.33 (©2003-2008 Technelysium Pty Ltda) e as sequências correspondentes ao vetor de clonagem foram excluídas.

Essas sequências foram convertidas em formato “fasta” e posteriormente analisadas com o programa CID (Freitas *et al.* 2008), para a prospecção de sequências de microssatélites compostas de um a seis pares de bases, repetidas no mínimo quatro vezes. Um total de 17 pares de *primers* foi desenhado utilizando o programa Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc., Hastings, NY). Testes de amplificação foram realizados com a utilização de 250 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µM de cada *primer*, 1X tampão da Biotools e 1 U *Taq* DNA polimerase (Biotools) em volume final de 10 µL. A amplificação foi permitida por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C para denaturação, 20 segundos a 56°C para hibridização, 1 minuto para extensão e um passo final de 1 hora a 72°C em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler. Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1%.

Dos 17 pares de *primers*, oito apresentaram amplificação positiva, sendo quatro monomórficos e quatro polimórficos. As condições de utilização para esses *primers* foram otimizadas a fim de se obter melhor qualidade de amplificação. O *primer forward* dos marcadores polimórficos foram marcados com fluorescência para análise do tamanho dos alelos no sequenciador automático MegaBace-1000 (GE Healthcare) e posterior leitura dos resultados no programa MegaBace Fragment Profiler versão 1.2 (GE Healthcare).

Para as estimativas da diversidade alélica, assim como para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação, foi utilizado o programa Arlequin (Excoffier *et al.* 2005) com o genótipo de 27 fêmeas provenientes de 27 ninhos da região de São Carlos (SP). Os valores da heterozigosidade observada variaram entre 0,5556 e 0,9259 e o número de alelos de 5 a 16 (Tabela 6). Não foram encontrados alelos nulos visto que foi observada amplificação para todos os 143 machos analisados, provenientes de 22 ninhos. Dentre os quatro locos polimórficos obtidos não houve diferença entre a heterozigosidade observada e a esperada, assim como não houve desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de Ligação.

Testes de amplificação foram feitos em outras espécies do gênero *Trypoxylon* e em *Sceliphron caementarium* e os resultados foram positivos para todos os pares de *primers* testados, exceto um (Tabela 7). Amplificação positiva para alguns locos foi obtida também em espécies de abelhas, o que demonstra uma boa taxa de transferabilidade destes marcadores.

Um teste de atribuição feito com 305 indivíduos de 22 famílias utilizando os quatro locos polimórficos atribuiu corretamente 82% dos indivíduos à suas famílias de origem, demonstrando a eficácia desses locos para estudos de paternidade (Capítulo 3). Sendo assim, os microssatélites desenvolvidos neste trabalho são ferramentas úteis para estudos do sistema de acasalamento e paternidade em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* e em outras espécies do gênero.

**Tabela 6)** Características das regiões de microssatélites isoladas para *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*.

Loco	Motivo repetido	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Tamanho (pb)	T (°C)	A	N	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	EHW (P)
Talb01	(TC) <sub>5</sub> TT (CT) <sub>3</sub>	<b>F:</b> CTAGCCTCAGGCGAATTC <b>R:</b> GATTCGAGTCTTGGTGCTAA	126	58	1	27	-	-	-
Talb02	(AG) <sub>3</sub> AA (AG) <sub>7</sub>	<b>F:</b> GTCAGCAAAGTGGTCATCC <b>R:</b> CGTAAACTGGTCACTGGTG	233	58	7	27	0,5556	0,5786	0,1310
Talb03	(GA) <sub>5</sub>	<b>F:</b> CTCCCAGAGCTGCAGTGT <b>R:</b> TACGAGACGGAAACAGAATG	199	54	1	27	-	-	-
Talb05	(AG) <sub>4</sub> AA (AG) <sub>5</sub>	<b>F:</b> GCAACTGAGAGATCGCTTC <b>R:</b> GTCTGTCAGCGAATAGTCAAG	172	52	11	27	0,8889	0,8239	0,7854
Talb06	(AG) <sub>9</sub>	<b>F:</b> GCACCGATATTATTAAGTCTCA <b>R:</b> TGGAAAGAAGTATACATGTTCCG	281	52	5	27	0,6296	0,6555	0,1657
Talb07	(TC) <sub>14</sub>	<b>F:</b> TCGCTGCCGACAATTATC <b>R:</b> GCAGTATTGAATCGGGTAAG	204	52	16	27	0,9259	0,8798	0,2440
Talb09	(GCT) <sub>5</sub>	<b>F:</b> GGCCAGAAGCGTAAGTAGA <b>R:</b> TGAGTGTATGTATTCGGCG	360	58	1	27	-	-	-
Talb12	(TC) <sub>3</sub> C (TCG) <sub>6</sub>	<b>F:</b> AGGCTGGGCGTAGATTTTC <b>R:</b> TCGTATAACCTGTAGATAATGCC	210	58	1	27	-	-	-

T - temperatura de hibridização; A - número de alelos observados; N - número de fêmeas genotipadas; H<sub>O</sub> - heterozigosidade observada; H<sub>E</sub> - heterozigosidade esperada; EHW (P) - valor de p para desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 7)** Resultados de testes de transferabilidade utilizando *primers* de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. As amplificações foram testadas em dois indivíduos de cada espécie.

	<i>Primers</i> testados							
	Talb01	Talb02	Talb03	Talb05	Talb06	Talb07	Talb09	Talb12
<i>Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trypoxylon (Trypoxylon) asuncicola</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Trypoxylon (Trypargilum) agamemnon</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Trypoxylon (Trypargilum) opacum</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Sceliphron caementarium</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>Centris analis</i>	*	+	+	+	-	+	-	-
<i>Euglosa cordata</i>	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Apis mellifera</i>	+	+	+	-	-	+	-	*
<i>Partamona helleri</i>	+	+	+	+	-	+	+	+

“+”: amplificação; “-”: não amplificação; “\*”: teste não realizado.

## 5- CAPÍTULO 3: “Comportamento de macho-guarda e paternidade em ninhos de *Trypoxylon* (*Trypargilum*) *albitarse* (Hymenoptera: Crabronidae)”

### 5.1- Introdução

Os machos do subgênero *Trypargilum* (Crabronidae) são conhecidos por auxiliarem as fêmeas no processo de nidificação (Richards 1934). Os machos que apresentam esse comportamento são conhecidos como machos-guarda e se caracterizam por permanecerem dentro de um ninho ativo enquanto a fêmea caça aranhas para aprovisionar suas células de cria. Nas espécies que constroem ninhos expostos eles também fazem o serviço de alisar o barro da parte interna dos ninhos em construção, de prensarem as aranhas no fundo das células de cria e afastar predadores, parasitóides e outros machos (Brockmann 1980).

Esse comportamento é bastante incomum entre os machos de insetos (Wilson 1971), porém não é único. Outros machos, inclusive de outras famílias, Sphecidae (Hymenoptera) (Hook & Matthews 1980) e Staphylinidae (Coleoptera) (Alcock 1991), por exemplo, apresentam um comportamento de guarda diferenciado. Foi observado que em todas as espécies de insetos em que há o comportamento de guarda, ocorrem fêmeas receptivas durante a nidificação e precedência espermática (Hook & Matthews 1980). A repetição da ocorrência desse comportamento de guarda em diferentes grupos de insetos pode ser compreendida se as semelhanças comportamentais entre elas forem analisadas e comparadas. Tsuji & Yamamura (1986) postularam um modelo de estratégia evolutivamente estável que mostra a razão da proporção entre duas estratégias de fertilização apresentadas pelos machos de uma população (guarda e patrulheiro) e que está relacionado ao período gasto por eles na pré-oviposição e na oviposição (garantia da fertilização). Assim, de acordo com eles, em uma mesma população podem coexistir ambas as estratégias, inclusive com valores de sucesso

reprodutivos proporcionais ao investimento. Pois, espera-se que uma pequena parte da prole pertença aos patrulheiros, já que esses não investem maior tempo na garantia da fertilização do que o tempo de duração de uma cópula, e a maior parte da prole seja atribuída aos guardas, já que investem muito tempo e energia ficando nos locais de nidificação das fêmeas, no intuito de garantir a fertilização dos óvulos mediante cópulas sucessivas.

Outro ponto a ser analisado, referente a essa repetição do comportamento de guarda, é a interação macho-fêmea e as possíveis vantagens que esses machos têm por apresentarem tal comportamento custoso. Baseado em dados comportamentais e até morfológicos, muito já foi discutido sobre a origem desse comportamento (Thornhill & Alcock 1983, Smith 1984). No entanto, poucas informações genéticas estão disponíveis. Dessa forma, este capítulo descreve o comportamento de guarda dos machos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, por meio de observações a campo e análises da estrutura genética dos ninhos, a fim de poder inferir a paternidade da prole e o sistema de acasalamento da espécie, e assim colaborar com a discussão sobre a origem deste comportamento.

## **5.2- Material e métodos**

### **5.2.1- Análise genética por locos microssatélites**

O DNA foi extraído a partir do mesossoma dos adultos, ou de larvas e pupas recém coletadas, usando modificações do protocolo de fenol-clorofórmio de Fernandes-Salomão *et al.* (2005). Amplificação por PCR de locos microssatélites seguiram os padrões descritos no capítulo 2 desta Dissertação. Os fragmentos gerados foram analisados em sequenciador MegaBACE –1000 (GE Healthcare) de acordo com o padrão de picos gerado para cada loco e fenotipados no programa MegaBace Fragment Profiler versão 1.2 (GE Healthcare).

### 5.2.2- Teste de robustez dos dados genéticos

Os programas GenAlex (Peakall & Smouse 2006) e Arlequin foram utilizados para o teste de atribuição, ou *assignment test*. Por adequação, como os programas não distinguem dados mistos de indivíduos haplóides e diplóides, a amostragem das fêmeas foi duplicada e os machos haplóides tiveram o seu genótipo diploidizado. Essa metodologia foi escolhida, pois mantém as proporções alélicas originais, apesar de subestimar o número amostral dos machos. No entanto, como o teste de atribuição se baseia nas frequências alélicas, este viés não é relevante para o resultado do mesmo.

Esse teste serviu para verificar a confiabilidade das informações dos marcadores microsatélites utilizados na genotipagem dos indivíduos. Ele consiste em analisar diferentes características de cada amostra e calcular a probabilidade dela pertencer a cada grupo já descrito *a priori*. Entende-se por amostra, indivíduos pertencentes a ninhos (grupos) de uma população. Conjuntamente ao teste de atribuição, também foi feito o teste de AMOVA. Esse teve a finalidade de agregar um valor numérico para a diferenciação dos grupos, embora originalmente ele seja utilizado para análises populacionais em que a aquisição das amostras é feita de maneira aleatória, diferentemente desta análise no qual as amostras apresentam distribuição familiar.

### 5.2.3- Estrutura genética dos ninhos

Foram utilizadas duas metodologias para a análise da estrutura genética dos ninhos: a inferência da paternidade com o uso do programa MateSoft (Moilanen et al. 2004) e a dedução dos genótipos dos parentais por meio da comparação dos genótipos dos indivíduos de cada ninho, o que também serviu para confirmar os resultados fornecidos pelo programa.

Para realizar as análises no programa MateSoft foi necessário inserir um arquivo de entrada (*input file*) contendo a discriminação de cada indivíduo com seus genótipos, ninho e

população a que pertenciam e as frequências alélicas para todos os locos, as quais foram obtidas a partir de 27 fêmeas provenientes de 27 ninhos diferentes. A partir desse primeiro arquivo de entrada o programa deduziu o genótipo de uma ou mais possíveis fêmeas nidificadoras para cada ninho, com suas respectivas probabilidades. Gerou em seguida um segundo arquivo de entrada para a dedução dos possíveis machos que fertilizaram essas fêmeas. Como o processo de dedução desses candidatos é feita em etapas, é possível o acréscimo ou a retirada de genótipos quando necessário. Por exemplo, se o genótipo de uma mãe é conhecido, basta retirar os genótipos deduzidos como fêmeas nidificadoras do ninho a que pertenciam e incluir o correto antes de calcular os genótipos dos possíveis machos que a fertilizaram. O programa MateSoft também discrimina para cada amostra o genótipo de seus possíveis parentais. Dessa forma, foi possível chegar ao sistema de acasalamento para a espécie *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*.

A obtenção do genótipo dos parentais de cada ninho, utilizando a segunda metodologia, baseou-se na segregação alélica nos gametas e na haplodiploidia arrenótoca dos himenópteros. Assim, para se chegar ao genótipo da fêmea nidificadora foi considerado o genótipo dos filhos. Como esses são haplóides, pois são formados por ovos não fertilizados, espera-se, em razão da segregação mendeliana, que metade da prole masculina possua um dos dois alelos da mãe. Em seguida, para se chegar ao genótipo do macho que a fertilizou, usou-se o genótipo das filhas em conjunto com o da fêmea nidificadora, pois, como as filhas devem ter um alelo da mãe e outro do pai, espera-se encontrar em todas elas, pelo menos, um alelo em comum, o alelo do pai que as gerou (Tabela 10a).

### **5.3- Resultados e discussão**



### 5.3.1- Teste de robustez

Os valores de  $F_{st}$ , tanto do Arlequin (0,271) quanto do GenAlex (0,264), demonstraram que há diferenciação genética significativa ( $p < 0,01$ ) entre os ninhos testados e que, portanto, os grupos familiares foram validados com a correta atribuição dos indivíduos. Como pode ser visto na Tabela 8, produzida pelo programa Arlequin, as amostras pertencentes ao ninho 17 possuíram maior valor de atribuição ao seu próprio ninho que a qualquer outro, fato que se repetiu com as amostras dos outros ninhos. O programa GenAlex ofereceu ainda um valor numérico a tal atribuição: 82% de todos os indivíduos genotipados foram atribuídos ao seu ninho original, enquanto 18% não o foram. Esses resultados demonstram que, apesar do pequeno número, os quatro locos microssatélites analisados têm poder de informação suficiente para a correta identificação e caracterização genética dos ninhos e que, portanto, permitem realizar a análise de paternidade desejada.

**Tabela 8)** Tabela produzida pelo teste de atribuição do Arlequin para demonstrar como são apresentados os resultados. Quanto maior o valor, maior é a chance do indivíduo pertencer ao ninho indicado (primeira linha, em negrito). Essa tabela é referente aos valores dos indivíduos do ninho 17.

Amostras ninho 17	13	16	17	33	109	124	133	142	145	148	151	153	154	157	158	159	160	163	166	Arr 1	Arr 13	Arr 18
<b>10911</b>	-30.035	-28.284	<b>-6.221</b>	-26.600	-36.428	-29.098	-29.843	-28.883	-40.756	-29.117	-31.460	-29.790	-20.514	-32.026	-31.312	-34.965	-33.242	-34.083	-32.109	-22.783	-30.370	-29.400
<b>10912</b>	-27.262	-12.909	<b>-2.612</b>	-25.080	-24.716	-17.098	-21.928	-25.705	-38.677	-27.037	-25.834	-23.559	-18.513	-25.471	-26.415	-21.201	-23.692	-26.340	-15.519	-18.986	-26.093	-24.168
<b>11891</b>	-27.955	-18.365	<b>-2.350</b>	-25.773	-25.409	-22.843	-29.118	-26.398	-39.370	-27.731	-26.527	-30.314	-13.240	-26.164	-27.109	-25.558	-24.385	-27.033	-17.128	-21.145	-28.983	-28.525
<b>11892</b>	-30.035	-18.183	<b>-3.002</b>	-16.498	-25.879	-18.549	-29.843	-16.585	-40.756	-18.379	-25.518	-29.790	-20.514	-32.026	-25.370	-29.023	-22.695	-22.864	-22.584	-22.783	-30.370	-19.875
<b>11893</b>	-27.262	-12.909	<b>-2.612</b>	-25.080	-24.716	-17.098	-21.928	-25.705	-38.677	-27.037	-25.834	-23.559	-18.513	-25.471	-26.415	-21.201	-23.692	-26.340	-15.519	-18.986	-26.093	-24.168
<b>11894</b>	-27.262	-13.785	<b>-3.528</b>	-31.383	-21.051	-18.197	-29.719	-31.449	-39.370	-33.099	-31.695	-30.518	-19.509	-24.660	-32.025	-22.299	-22.188	-26.979	-12.142	-24.596	-29.757	-30.134
<b>11895</b>	-27.262	-12.909	<b>-2.612</b>	-25.080	-24.716	-17.098	-21.928	-25.705	-38.677	-27.037	-25.834	-23.559	-18.513	-25.471	-26.415	-21.201	-23.692	-26.340	-15.519	-18.986	-26.093	-24.168
<b>11896</b>	-27.955	-18.365	<b>-2.350</b>	-25.773	-25.409	-22.843	-29.118	-26.398	-39.370	-27.731	-26.527	-30.314	-13.240	-26.164	-27.109	-25.558	-24.385	-27.033	-17.128	-21.145	-28.983	-28.525
<b>11897</b>	-28.649	-18.548	<b>-3.448</b>	-27.719	-17.163	-19.360	-44.038	-26.686	-40.756	-29.117	-35.854	-42.323	-21.118	-29.018	-35.203	-29.834	-18.300	-22.756	-14.445	-32.617	-36.311	-30.422
<b>11898</b>	-30.035	-8.658	<b>-4.913</b>	-16.498	-25.879	-8.447	-16.849	-16.585	-40.756	-18.379	-25.518	-17.667	-32.446	-32.026	-25.370	-21.696	-22.695	-22.864	-20.751	-19.850	-25.975	-12.547
<b>10911</b>	-30.035	-28.284	<b>-6.221</b>	-26.600	-36.428	-29.098	-29.843	-28.883	-40.756	-29.117	-31.460	-29.790	-20.514	-32.026	-31.312	-34.965	-33.242	-34.083	-32.109	-22.783	-30.370	-29.400
<b>10912</b>	-27.262	-12.909	<b>-2.612</b>	-25.080	-24.716	-17.098	-21.928	-25.705	-38.677	-27.037	-25.834	-23.559	-18.513	-25.471	-26.415	-21.201	-23.692	-26.340	-15.519	-18.986	-26.093	-24.168
<b>11891</b>	-27.955	-18.365	<b>-2.350</b>	-25.773	-25.409	-22.843	-29.118	-26.398	-39.370	-27.731	-26.527	-30.314	-13.240	-26.164	-27.109	-25.558	-24.385	-27.033	-17.128	-21.145	-28.983	-28.525
<b>11892</b>	-30.035	-18.183	<b>-3.002</b>	-16.498	-25.879	-18.549	-29.843	-16.585	-40.756	-18.379	-25.518	-29.790	-20.514	-32.026	-25.370	-29.023	-22.695	-22.864	-22.584	-22.783	-30.370	-19.875
<b>11893</b>	-27.262	-12.909	<b>-2.612</b>	-25.080	-24.716	-17.098	-21.928	-25.705	-38.677	-27.037	-25.834	-23.559	-18.513	-25.471	-26.415	-21.201	-23.692	-26.340	-15.519	-18.986	-26.093	-24.168
<b>11894</b>	-27.262	-13.785	<b>-3.528</b>	-31.383	-21.051	-18.197	-29.719	-31.449	-39.370	-33.099	-31.695	-30.518	-19.509	-24.660	-32.025	-22.299	-22.188	-26.979	-12.142	-24.596	-29.757	-30.134
<b>11895</b>	-27.262	-12.909	<b>-2.612</b>	-25.080	-24.716	-17.098	-21.928	-25.705	-38.677	-27.037	-25.834	-23.559	-18.513	-25.471	-26.415	-21.201	-23.692	-26.340	-15.519	-18.986	-26.093	-24.168
<b>11896</b>	-27.955	-18.365	<b>-2.350</b>	-25.773	-25.409	-22.843	-29.118	-26.398	-39.370	-27.731	-26.527	-30.314	-13.240	-26.164	-27.109	-25.558	-24.385	-27.033	-17.128	-21.145	-28.983	-28.525

### 5.3.2- Comportamento de Guarda, paternidade e estrutura sociogenética dos ninhos

Para as análises genéticas foram selecionados ninhos em que havia, pelo menos, sete indivíduos ou um dos parentais. Assim, foram analisados 305 indivíduos de 22 ninhos, sendo que os casais de quatro ninhos, o macho-guarda de dois ninhos e a fêmea nidificadora de um ninho foram coletados, assim como as crias de todos os ninhos. Em todas as progênes, foi atribuído, pelo menos, uma mãe e um pai para a prole. Em seis dos ninhos, toda a prole pode ser atribuída a um único casal. Em três destes, as crias eram progênes de duas fêmeas, sendo a nidificação sequencial e sem sobreposição temporal. Em outros seis, foi encontrada prole pertencente a uma segunda fêmea em células de cria da região central do ninho, indicativo de que não foi nidificação sequencial e sim uma possível usurpação por outra fêmea. Finalmente, em nove ninhos foram detectadas crias cuja paternidade não foi possível atribuir ao macho-guarda dos respectivos ninhos, caracterizando a promiscuidade da fêmea. Apesar desses números aparentemente rejeitarem a hipótese inicial de que a prole de cada ninho pertence a um pai e uma mãe, casos de usurpação e de cópulas extra-par por parte das fêmeas foram encontradas em uma ou, no máximo, duas células de cria por ninho (ver Tabela 9 para resumo desses resultados e Tabela 10 onde está descrita a diversidade de ninhos genotipados). Vale notificar também que foram feitos previamente testes de paternidade em alguns poucos ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* usando marcadores alozímicos. Nesse caso, a paternidade da prole feminina de um ninho pôde ser atribuída a um único macho em quatro de sete ninhos. Contudo, esse resultado se baseou no único marcador com diversidade alélica favorável encontrada (esterase-2) dentro de 17 testados, refletindo o baixo polimorfismo revelado por essa técnica.

**Tabela 9)** Resumo dos resultados da análise da estrutura genética dos ninhos. A captura dos adultos ocorreu durante a nidificação da última célula e a da prole 35 dias após o término do ninho. DP = desvio padrão.

---

Dados	
305	indivíduos genotipados
22	ninhos
13,7	indivíduos por ninho ( $\pm 4,8$ DP)
4 ninhos	prole, nidificadora e guarda coletados
2 ninhos	prole e guarda coletados
1 ninho	prole e nidificadora coletadas
15 ninhos	só a prole coletada

---

Inferências sobre a estrutura familiar	
22 ninhos	predominância de um casal na nidificação
6 ninhos	Atribuição somente a um casal
3 ninhos	nidificação sequencial de duas fêmeas
6 ninhos	1 ou 2 células de cria com maternidade não atribuída à fêmea do ninho
9 ninhos	1 ou 2 células de cria com paternidade não atribuída ao macho do ninho
2 ninhos	tanto maternidade, quanto paternidade de algumas células de cria não foram atribuídas ao casal do ninho

---

**Tabela 10)** Diversidade de tipos de ninhos encontrados, usando o loco *Talb07* como exemplo. a) prole pertencente a somente um casal; b) célula de cria na porção central do ninho indicando usurpação (negrito); c) estrutura genética do ninho evidenciando nidificação sequencial de duas fêmeas (uma em itálico e a outra em negrito), no caso com o mesmo pai (guarda); d) células de cria indicando cópulas extra-par da fêmea com algum patrulheiro (negrito). Na prole, os machos haplóides estão em azul e as fêmeas diplóides em vermelho.

a)

Ninho	Prole	Guarda	Nidificadora
célula 01	216	212	208/216
célula 02	212/208		
célula 03	208		
célula 04	212/216		
célula 05	212/208		
célula 06	212/216		
célula 07	216		
célula 08	212/216		
célula 09	216		
célula 10	212/208		
célula 11	208		
célula 12	212/216		
célula 13	208		
célula 14	212/208		
célula 15	216		
célula 16	208		

b)

Ninho	Prole	Guarda	Nidificadora
célula 01	216	212	208/216
célula 02	212/208		
célula 03	208		
célula 04	212/216		
célula 05	212/208		
célula 06	212/216		
célula 07	200		
célula 08	212/216		
célula 09	216		
célula 10	212/208		
célula 11	208		
célula 12	212/216		
célula 13	208		
célula 14	212/208		
célula 15	216		
célula 16	208		

<b>Usurpadora</b>
200/?

c)

Ninho	Prole	Guarda	Nidificadora I
célula 01	216	212	208/216
célula 02	212/208		
célula 03	208		
célula 04	212/216		
célula 05	212/208		
célula 06	212/216		
célula 07	216		
célula 08	212/216		
célula 09	200		
célula 10	212/200		
célula 11	210		
célula 12	200		
célula 13	212/210		
célula 14	212/200		
célula 15	210		
célula 16	212/210		

<b>Nidificadora II</b>
200/210

d)

Ninho	Prole	Guarda	Nidificadora
célula 01	216	212	208/216
célula 02	212/208		
célula 03	208		
célula 04	212/216		
célula 05	212/208		
célula 06	200/216		
célula 07	216		
célula 08	212/216		
célula 09	216		
célula 10	212/208		
célula 11	208		
célula 12	210/216		
célula 13	208		
célula 14	212/208		
célula 15	216		
célula 16	208		

<b>Patrulheiro I</b>
200

<b>Patrulheiro II</b>
210

Referente à usurpação, essa ocorre quando uma fêmea invasora oviposita na célula de cria do ninho que está sendo provisionado por outra fêmea. Ela pode ser detectada por análise genética do ninho quando o genótipo de um indivíduo da progênie não possui um dos alelos da nidificadora e se encontra em uma célula de cria da parte central do ninho (Tabela 10b). Brockmann (1980) descreveu cinco estratégias de nidificação para *Trypoxylon (Trypargilum) politum*, sendo que duas delas podem ser identificadas como usurpação pelas análises genéticas: a usurpação em si e a nidificação simultânea. Essa última é incomum e ocorre provavelmente em razão das fêmeas não distinguirem entre um ninho abandonado e um que está sendo provisionado (Brockmann 1980). Assim como em *Trypoxylon (Trypargilum) politum*, *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* também nidifica em ninhos construídos por outras fêmeas e, portanto, é possível que duas fêmeas nidifiquem simultaneamente no mesmo ninho. Esse evento foi observado uma única vez e foi interrompido quando as duas fêmeas chegaram juntas carregando aranhas paralisadas. Elas se lançaram uma contra a outra até que uma foi expulsa. O macho-guarda permitiu que ambas nidificassem neste ninho. Como resultado desse evento, se bem sucedido pela fêmea não predominante daquele ninho, a prole daquela célula de cria não pertenceria à fêmea do ninho e, portanto, pela análise genética, isso seria classificado como usurpação.

Outra possibilidade de detectar usurpação seria se a usurpadora tivesse invadido o ninho quando esse estivesse sozinho, com a nidificadora caçando aranhas e o macho ter saído para se alimentar, por exemplo. No entanto, em nossas observações a campo o macho-guarda não foi visto sair do ninho sem que houvesse algum estímulo da parte do observador. Brockmann & Grafen (1989) sugerem que o macho-guarda é capaz de se alimentar do fluído protéico das aranhas provisionadas, o que seria motivo adicional para ele não abandonar o ninho. Também foi observado que o macho-guarda desta espécie repele fêmeas que se aproximam do seu ninho; portanto, era de se esperar que ele não copulasse com outras

fêmeas. Todavia, as análises indicaram que em três dos seis ninhos em que houve usurpação, a paternidade da cria pode ser imputada ao macho-guarda. Apesar desses resultados serem conflitantes, durante as observações foi possível notar em *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons*, machos-guarda saírem de seus ninhos, copularem com outras fêmeas e retornarem ao seu posto de guarda. Brockmann (1992), Coville & Coville (1980) e Garcia & Adis (1995) também descreveram esse comportamento em *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae*, *Trypoxylon (Trypargilum) tenocitlan* e *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi*, respectivamente, e é possível que o mesmo aconteça em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, porém neste, seja mais raro o macho permitir a aproximação de outra fêmea, o que diminuiria a chance do comportamento ser observado.



**Figura 23)** Cópula em *Trypoxylon agagemnon* (foto de cima) (foto tirada no Parque das Araucárias, Guarapuava – PR) e em *Trypoxylon rogenhoferi* (foto de baixo) (foto tirada na fazenda Canchim – Embrapa, São Carlos – SP); nos dois casos, as fêmeas haviam acabado de chegar com uma aranha ao ninho. (Foto: Juliano Almeida)



Considerando o comportamento dos machos, como guarda e patrulheiro, nota-se que a diferença entre essas duas estratégias está no investimento que fazem na garantia da fertilização. Isso é observado não só entre as espécies de *Trypargilum*, mas também em outros insetos em que há a ocorrência de guarda (Hook & Matthews 1980, Alcock 1991). O modelo criado por Tsuji & Yamamura (1986) para estimar a proporção de machos patrulheiros e guarda em uma população se baseia no tempo que investem na fertilização. Assim, afirmam que há um equilíbrio dinâmico entre essas duas estratégias. Considerando este pressuposto e o fato de que todos os ninhos acompanhados neste trabalho possuíam um macho-guarda, há de se ressaltar que 19 das 146 filhas analisadas não tiveram sua filiação atribuída a ele. Entende-se que, pelo modelo de Tsuji & Yamamura (1986), em média, 13% dos machos daquela população, e naquele momento, deveriam estar apresentando o comportamento de patrulheiro, já que foi essa a porcentagem de falha do guarda em garantir a paternidade da prole feminina.

Considerando então esse equilíbrio dinâmico entre essas duas estratégias, é provável que a origem do comportamento de guarda se deu a partir de machos semelhantes aos patrulheiros que permaneciam mais tempo junto às fêmeas na tentativa de aumentar a chance de fertilizar seus óvulos. No início, provavelmente, tanto machos quanto fêmeas eram poligâmicos. Para elas, essa característica é vantajosa, pois mantém o estoque de espermatozoides na espermateca sempre cheio, garantindo uma fertilidade prolongada; aumenta a diversidade genética da prole, o que é vantajoso em ambientes instáveis; não precisa gastar energia rejeitando machos; aumenta a chance de receber benefícios dos machos, como proteção e recursos (Thornhill & Alcock 1983). Além da poligamia, elas também deveriam apresentar receptividade contínua durante a nidificação. Essas duas características juntas criam um ambiente de alta competitividade entre os machos para conseguir manter a espermateca da fêmea cheia com os seus espermatozoides, já que elas podem se encontrar

com outro macho logo depois da cópula, principalmente se a última carga de espermatozóide estocada na espermateca for a que tiver maior chance de fecundar os óvulos (precedência espermática) (Smith 1984). Hook & Matthews (1980) observaram que em todas as espécies de insetos em que há o comportamento de guarda ocorrem fêmeas receptivas durante a nidificação e a precedência espermática.

Sendo assim, os machos que tinham a tendência de permanecer junto às fêmeas logo após a cópula e afastar outros machos que se aproximavam foram positivamente selecionados. Alcock (1991) descreveu esse comportamento de guarda pós-copulatória para *Ontholestes cingulatus* (Coleoptera: Staphylinidae). Os machos, logo após a cópula, ficam seguindo as fêmeas até essas nidificarem. Caso outro macho se aproxime, eles lutam até um se afastar. Se ocorrer a cópula extra-par ou a troca do parceiro, o macho vencedor copula com a fêmea diversas vezes. Essa repetição de cópulas é uma forte evidência da ocorrência de precedência espermática (Alcock 1991).

A permanência do macho junto à fêmea logo após a cópula permitiu o surgimento de diversas estratégias de fertilização com base na precedência espermática. Desde machos que acompanham as fêmeas até a oviposição, passando por machos que ficam empoleirados próximos às áreas de nidificação, a machos que permanecem dentro de ninhos ativos esperando pela nidificadora (macho-guarda) (Thornhill & Alcock 1983). Em todos esses casos, os machos gastam tempo e energia a fim de serem os últimos a copularem com a fêmea e, assim, garantirem a paternidade. Permanecer dentro do ninho em que a fêmea está nidificando, garante a eles cópulas momentos antes da oviposição, o que aumentaria a chance de fertilizar os óvulos dela.

No entanto, será que esse aumento da chance de fertilização é justificado pelo esforço feito pelo macho-guarda? Banks (1995) encontrou uma correlação positiva entre o tempo que o macho de *Cerceris binodis* (Hymenoptera: Sphecidae) gastava guardando o ninho e o número

de cópulas que obtinha. Em *Trypargilum* (Brockmann 1980, Coville & Coville 1980, Brockmann 1992, Garcia & Adis 1995) e em alguns outros crabronídeos (*Oxybelus sericeus*, *Oxybelus subulatus* e *Cerceris binodis*, Hook & Matthews 1980, Peckham 1977 e Banks 1995, respectivamente) em que ocorre o comportamento de guarda, os machos copulam repetidamente com as fêmeas. Isso ocorre principalmente quando elas retornam ao ninho (em *Trypargilum* ocorre “cópulas curtas”), e momentos antes da oviposição (em *Trypargilum* ocorrem cópulas mais longas) (Figura 23). Brockmann & Grafen (1989) suspeitaram que essas variantes de cópulas estivessem relacionadas com a garantia da paternidade. Walker (1980) sugere que a pressão de seleção, exercida pela poliandria da fêmea sobre os machos os direcionou a adaptações como a limpeza da espermateca das fêmeas. Sendo assim, as “cópulas curtas”, na verdade, seriam os machos-guarda retirando esperma de outros machos da espermateca da fêmea e as cópulas estendidas seriam as cópulas em si. A aquisição de uma adaptação desse calibre conferiria ao macho-guarda alto índice de paternidade, mesmo com a fêmea copulando com outros machos. Talvez isso justifique as observações feitas a campo de que as fêmeas de *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons* copulavam com patrulheiros ao lado da entrada do ninho, e o macho-guarda permitia tais cópulas. No entanto, logo após o patrulheiro ir embora, o guarda copulava com a fêmea repetidamente. Em um trabalho com *Calopteryx maculata* (Odonata: Calopterygidae), Waage (1979) observou que o pênis dos machos removia entre 88% e 100% do esperma de cópulas anteriores da espermateca das fêmeas. Neste trabalho, esse tipo de estudo morfológico não foi feito; no entanto, as análises genéticas dos ninhos de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* mostraram que 87% da prole feminina são atribuíveis ao macho-guarda. Além disso, pelo comportamento comum de “cópulas curtas” observado no subgênero, é esperado encontrar esse mecanismo de aumento da eficácia da fertilização dos óvulos, o que justificaria o predomínio da monogamia genética encontrada em cada ninho apesar do comportamento poliândrico da fêmea.

As adaptações apresentadas por esses machos surgiram como alternativa para elevar os seus sucessos reprodutivos por meio do aumento da paternidade sobre o ninho que atuavam. Contudo, parece que a partir de um ponto, a permanência dos machos nos ninhos permitiu surgir outra estratégia que elevasse o seu sucesso reprodutivo. O comportamento de guarda adquirira novas funções. Os machos que, além de permanecerem dentro do ninho, auxiliassem na nidificação e na proteção do mesmo, teriam o seu sucesso reprodutivo aumentado por elevarem as chances da fêmea a nidificar mais e mais rapidamente (Brockmann 1992).

Segundo Grafen (1980), um macho que investe em uma fêmea (guardando o ninho, por exemplo), e não copula com outras, provavelmente irá investir nessa última até o ponto em que garanta a paternidade da prole e depois a abandonará. Esse comportamento foi observado nos machos de *Trypoxylon (Trypargilum) tenocticlan* (Coville & Coville 1980) e de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, no qual eles abandonavam o ninho quando a fêmea começava a fechar com barro a última célula de cria. Talvez isso seja um resquício da existência da fase proposta por Grafen (1980). Esse tipo de comportamento dos machos provavelmente foi moldado, a princípio, para que eles permanecessem nos ninhos e não necessariamente para defendê-los. Na subgênero *Trypargilum* os machos são vistos defendendo arduamente seus ninhos contra parasitóides e coespecíficos, em todas as espécies isso foi encontrado, embora também tenha sido possível observar um macho de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* não defender o seu ninho de ser parasitado (Figura 19). Os machos dessa última espécie, assim como de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* e *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* apresentaram muita resistência para saírem dos tubos de barro, mesmo quando provocados pelo observador. O mesmo não aconteceu com os machos de *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons* e *Trypoxylon (Trypargilum) nitidum*, os quais saíam do ninho para afastar parasitóides, outros machos (Figura 24), ou mesmo sobrevoar o observador

quando provocados, e depois retornarem à condição de guarda. Brockmann & Grafen (1989) já haviam reparado que espécies de tamanho menor, como as duas últimas referidas, são mais defensivas. A espécie *Trypoxylon (Trypargilum) politum*, que se assemelha morfologicamente a *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Sandhouse 1940), não apresentou parasitismo diferenciado entre ninhos bem e mal guardados por machos (Brockmann & Grafen 1989). Por outro lado, em outro esfecídeo (*Oxybelus sericeus*) a presença do macho-guarda diminuiu a taxa de parasitismo (Hook & Matthews 1980). Essa variedade de comportamentos, em conjunto com a idéia de Grafen (1980), indicaria que o aspecto defensivo do comportamento de guarda é derivado e permanecer dentro do ninho para garantir a paternidade é mais primitivo.



**Figura 24)** Dois machos de *Trypoxylon aurifrons* lutando; o macho de baixo é um patrulheiro que estava tentando ocupar a célula de cria no tubo de barro já ocupado por um macho-guarda. (Foto: Juliano Almeida)

Além da defesa do ninho, os machos de *Trypargilum* também são observados auxiliando na nidificação. Nos trabalhos com espécies que nidificam em ninhos armadilha (Coville & Coville 1980, Garcia & Adis 1995), os machos foram vistos ajudando a carregar as aranhas da entrada ao fundo do tubo e a prensar as aranhas contra o fundo. Nas espécies em que a fêmea constrói seus ninhos com tubos de barro, como em *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (Brockmann 1992), em *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Brockmann 1980) e em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (este trabalho), os machos além de auxiliarem na compactação das aranhas, também cuidaram do acabamento interno do tubo, alisando-o enquanto o barro ainda se encontrava fresco (Figura 25). Apesar desse auxílio à construção e ao provisionamento, esse comportamento não pode ser considerado um cuidado paterno, já que aparentemente não está aumentando o sucesso reprodutivo da prole. Nos insetos é raro encontrar o cuidado paternal (Wilson 1971); no entanto, é de se esperar maior chance de encontrá-lo em grupos de insetos em que os machos já auxiliem as fêmeas na nidificação. Segundo Smith (1984), limitações filogenéticas impedem o surgimento do cuidado paterno em alguns grupos de himenópteros. Utilizando *Trypoxylon (Trypargilum) politum* como exemplo, este autor afirma que, por não possuir ferrão, o macho dessa espécie não tem capacidade de caçar as presas e, portanto, o seu investimento ficaria limitado à compactação das aranhas e à proteção do ninho. Talvez, por eles não possuírem esse meio direto de investir na prole, o cuidado paterno não tenha surgido entre as espécies de *Trypargilum*.

Mesmo sem o cuidado paternal, os machos dessas espécies que apresentam as qualidades de guarda têm nesse comportamento um diferencial da maioria dos machos de himenópteros. E assim, unindo o conhecimento da biologia dessa ordem com as novas informações genéticas de *Trypoxylon*, que pertencem à família Crabronidae, será possível incrementar o conhecimento sobre a origem do comportamento social nos himenópteros,

considerando que essa família é a mais relacionada filogeneticamente às abelhas (Melo 1999), para as quais já foram descritas 13 origens independentes da eussocialidade (Michener 1974).



**Figura 25)** Macho de *Trypoxylon albitarse* alisando a parte interna da parede do ninho recém construída enquanto a fêmea buscava mais barro para a construção do tubo. (Foto: Juliano Almeida)

### 5.3.3- Sistema de Acasalamento

Considerando sistema de acasalamento o modo como os indivíduos sexualmente maduros de uma espécie investem na formação de pares reprodutivos, o subgênero *Trypargilum* vem sendo classificado como promíscuo. Há registros de que as fêmeas copulam com outros machos além do guarda e que os machos-guarda copulam com outras fêmeas que se aproximam do ninho em *Trypoxylon (Trypargilum) tenocitlan* (Coville & Coville 1980), em *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Brockmann & Grafen 1989), em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Amarante 1991) e em *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (Brockmann 1992). Nas observações a campo, foi constatado machos-guarda de *Trypoxylon (Trypargilum)*

*aurifrons* saindo de seus ninhos para copularem com outras fêmeas. A cópula ocorria ao lado do orifício de entrada das células de cria e, logo depois, ele retornava à função de guarda e a fêmea ia embora. Foi igualmente observado para essa espécie cópulas extra-par por parte da fêmea nidificadora. Essa, ao pousar próximo ao ninho, foi receptiva e copulou com um macho patrulheiro. O macho-guarda assistiu a cópula sem sair do ninho; porém, quando a fêmea se aproximou, eles copularam repetidamente. A descrição das cópulas extra-par na literatura para outras espécies, em essência, não se diferencia muito dessa. No entanto, o acompanhamento do processo de nidificação em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* indicou uma tendência à monogamia social. Não foram observadas fêmeas nidificadoras copulando com outros machos além do macho-guarda de seu próprio ninho. Por exemplo, caso estivesse ocorrendo conflito entre o macho-guarda e um patrulheiro, a fêmea ignorava ambos e mantinha a sua atividade de nidificação. No caso dos machos-guarda, eles ficavam praticamente o tempo todo dentro do tubo de barro e não aceitavam a aproximação de machos ou outra fêmea, exceto a nidificadora. Quando um patrulheiro se aproximava, o guarda ficava somente com a cabeça para fora do ninho (Figura 5) e quando o invasor estava à grande distância, ele ficava postado à entrada do tubo de barro (Figura 26). Quando era uma fêmea que se aproximava, o guarda sempre permitia um toque de antenas; caso não fosse a nidificadora, ele a expulsava. Quando ele se encontrava no fundo do tubo, a fêmea invasora entrava e logo era expulsa. Não havia tempo para a ocorrência de cópulas, tanto assim que algumas vezes ela saía de ré, pois o macho não lhe dava tempo para se virar e sair de dentro do ninho.





**Figura 26)** Macho de *Trypoxylon nitidum* postado à entrada da célula de cria o qual estava de guarda. Essa postura é feita quando há um macho patrulhando próximo ao ninho. O mesmo padrão de postura foi observado em *T. aurifrons* e *T. albitarse*. (Foto: Juliano Almeida).

Os dados da estrutura genética dos ninhos mostraram que há predomínio da paternidade da prole para um só macho em todos os ninhos. Na verdade, como a literatura considera que a fêmea tem comportamento poliândrico (Coville & Coville 1980, Brockmann & Grafen 1989, Amarante 1991, Brockmann 1992), era de se esperar que a paternidade do macho-guarda em relação à prole fosse apenas parcial. Os resultados genéticos também demonstraram que, há sim, o predomínio de um casal durante a construção e o provisionamento de um ninho (monogamia genética). No entanto, o início de um novo ninho também pode resultar na troca de um dos parceiros (poligamia). Ninhos que eram construídos próximos a outros ninhos recentemente finalizados (há um ou dois dias) foram considerados como pertencentes ao mesmo casal. Apesar das análises genéticas terem confirmado essa suposição na maioria das vezes, houve casos em que ocorreu a troca de um dos membros do

casal - duas vezes para a troca da fêmea e a permanência do macho-guarda e três vezes para a troca do macho-guarda e a permanência da fêmea. Além disso, em um tubo de barro longo pode haver dois conjuntos de prole pertencentes a diferentes casais. Essas informações sobre o predomínio de um casal por ninho e a possibilidade da formação de um novo casal ao iniciar nova nidificação confluem para o que já havia sido descrito por Coville & Coville (1980) para *Trypoxylon (Trypargilum) tenocitlan* a partir de dados observacionais. Este trabalho, portanto, contribui para a discussão sobre o comportamento poliândrico da fêmea, embora como resultado final, cada macho consiga garantir a sua predominância na prole feminina do ninho que está guardando (monogamia genética).

#### **5.3.4- Machos diplóides**

Machos diplóides em himenópteros normalmente não estão associados a populações estáveis e em crescimento e sim a populações pequenas e submetidas a acasalamentos endogâmicos (van Wilgenburg *et al.* 2006). Isso ocorre porque acredita-se que, como *Apis mellifera*, os machos diplóides de *Trypoxylon* sejam resultantes da homozigose no loco sexual (*csd*, *complementary sex determination*). Apesar da diversidade de categorias sobre a sua viabilidade e capacidade reprodutiva (Heimpel & de Boer 2008), a produção de machos diplóides sempre tende a diminuir o valor adaptativo da fêmea que os originou, pois o que era para ser um ovo de fêmea (diplóide) acaba se tornando um ovo de macho (diplóide). A ocorrência de machos diplóides pode alterar a razão sexual da população de maneira significativa se produzido em grande quantidade. Sendo assim, qualquer estratégia que dificulte a produção dos mesmos certamente teria sua frequência aumentada nas populações. Duas dessas estratégias, que podem levar a valores adaptativos semelhantes, são: a fêmea reconhecer machos com o alelo sexual igual ao seu e não se acasalar com eles, ou a fêmea tender a copular com diversos machos e, assim, gerar uma prole com maior diversidade alélica

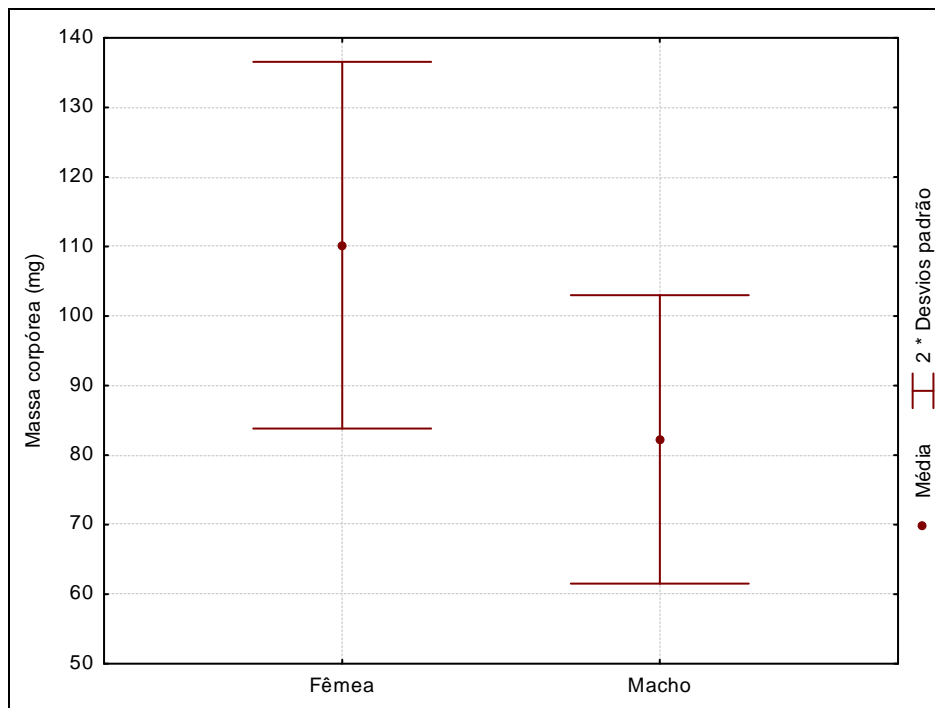
para o loco sexual (Thornhill & Alcock 1983). Apesar dessa última estratégia permitir que ela produza machos diplóides, esses ocorrerão em baixa proporção frente à grande maioria de prole feminina. Aparentemente a primeira estratégia é muito mais eficaz, pois reduziria a zero a produção de machos diplóides; no entanto, é uma estratégia de alta complexidade biológica, pois seria necessário o reconhecimento de machos com o mesmo alelo sexual. Já a segunda estratégia, ainda que não resulte em quantidades menores de machos diplóides na população, faz com que esses sejam dispersos entre diversas fêmeas, além de trazer consigo a vantagem de aumentar a diversidade genética da prole. Para *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* essa segunda estratégia parece ser a predominante, considerando os dados de observação a campo e as análises genéticas dos ninhos. Ainda mais por as fêmeas apresentarem comportamento poliândrico.

Foram analisados 22 ninhos (305 indivíduos), cada um dos quais representado por um casal. Dezesete cópulas extra-par por parte da fêmea foram detectados e o teste de atribuição indicou que não havia ninhos geneticamente iguais. Esses dados mostram que houve 39 uniões diferentes entre machos e fêmeas (prole com 143 haplóides e 162 diplóides). Dentre estas uniões, cinco levaram à formação de machos diplóides, sendo três com o guarda (sete indivíduos) e duas com patrulheiros (dois indivíduos) (Tabela 11). Isso quer dizer que 12,8% das uniões entre machos e fêmeas geraram prole com machos diplóides. No entanto, apesar dessa porcentagem ser relativamente alta, ela representa somente 5,5% da prole diplóide, sendo os outros 94,5% prole feminina. Logo, a estratégia de poliandria das fêmeas de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* parece ser também uma estratégia que mantém baixa a proporção de machos diplóides na população. Vale lembrar que as análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação para os locos analisados mostraram falta de endogamia na população e ausência de alelos preferencialmente associados nos gametas, respectivamente (Capítulo 2).

**Tabela 11)** Resumo dos dados referentes aos machos diplóides. Na coluna da direita encontra-se a quantidade de indivíduos formados pelo tipo de união correspondente da coluna da esquerda. Cada união de macho e fêmea se refere a um casal formado que gerou pelo menos um indivíduo diplóide. Ela pode ser formada entre uma fêmea e o macho-guarda (ninho) ou entre uma fêmea e um patrulheiro (cópula extra-par).

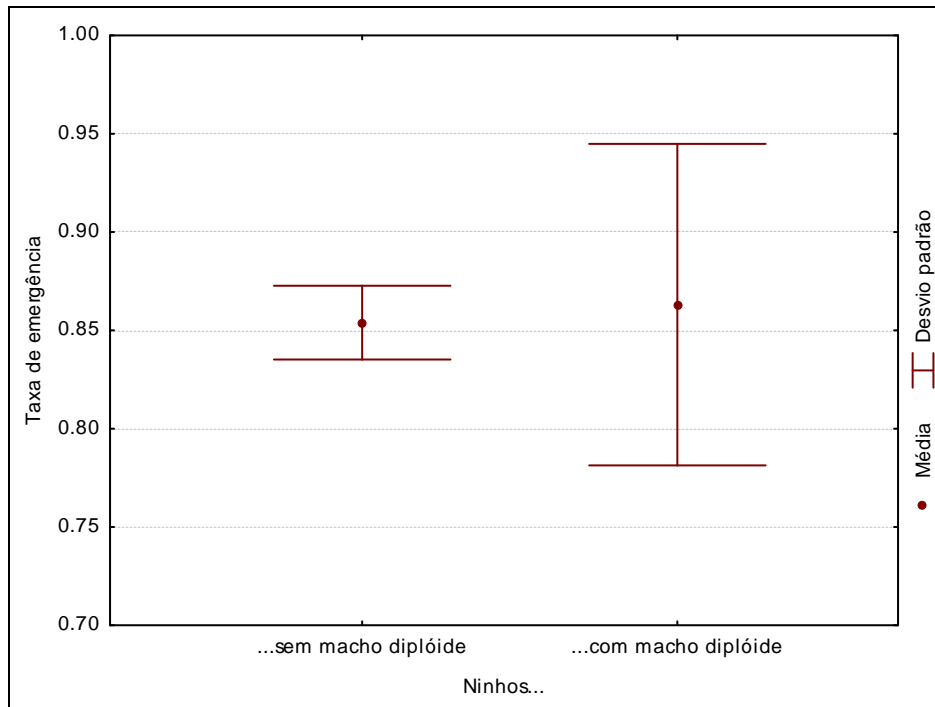
Geral	
22 ninhos	305 indivíduos
17 cópulas extra-par	
39 uniões de machos e fêmeas	gerou 162 diplóides e 143 haplóides
Uniões que levaram a machos diplóides	
5 uniões de machos e fêmeas	9 indivíduos
3 sendo os pais o guarda	7 indivíduos
2 sendo os pais patrulheiros	2 indivíduos

A fim de estimar se algumas das células de cria em que o ovo ou a larva não completaram o seu desenvolvimento eram células de macho diplóide, verificou-se se havia associação entre o comprimento das células de cria dos machos diplóides com o de fêmeas e machos. Das quatro medidas obtidas, três estavam na área da distribuição em que há sobreposição das medidas entre células de machos e fêmeas (1,7 a 2,1cm de comprimento) e somente uma foi classificada como célula de macho. Era esperado que as células de machos diplóides se distribuíssem ao redor da média das células de fêmeas (já que receberam grande quantidade de alimento) e não que predominassem entre as classes intermediárias dos dois sexos. Usando o mesmo raciocínio comparativo, porém em relação à massa corpórea, e supondo que o metabolismo de machos e fêmeas seja similar até a fase adulta, era de se esperar que machos diplóides fossem, em média, mais pesados que os haplóides, tendo em vista que receberam mais alimento. Em concordância, todos os machos diplóides que tiveram a massa medida mostraram o peso dentro de 95% da distribuição do peso de fêmeas, sendo que cinco deles apresentaram massa acima de 95% da distribuição verificada para machos (Figura 27).



**Figura 27)** Distribuição da massa corpórea de machos e fêmeas dos ninhos analisados. Foram usadas distribuições com dois desvios padrão para representar 95% das amostras e aumentar a acurácia da análise (n= 284 indivíduos).

Apesar de que não houve um delineamento prévio para estimar a taxa de emergência da prole em ninhos com e sem machos diplóides, foi estimada a razão entre ‘prole emergente’/‘total de células de cria dos ninhos’ de forma a detectar alguma viabilidade diferencial entre ninhos com somente indivíduos normais e ninhos com machos diplóides presentes. No entanto, não houve diferença significativa (ANOVA;  $F= 0,0230$ ;  $p= 0,8806$ ) e, portanto, não foi possível estabelecer uma taxa de emergência diferencial em ninhos que apresentaram e os que não apresentaram machos diplóides em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* (Figura 28).



**Figura 28)** Comparação da taxa de emergência dos ninhos com e sem machos diplóide (n=22 ninhos).

Estudos mais direcionados, o que inclui um maior número amostral, são necessários a fim de esclarecer melhor a ocorrência de machos diplóides em *Trypoxylon*. Da mesma maneira, para melhor compreender o sistema de acasalamento dessas vespas crabronídeas, assim como a paternidade e o comportamento de macho-guarda, é necessária a obtenção de mais informações da biologia de nidificação de outras espécies e da estrutura sociogenética de seus ninhos. Pois, enquanto as observações podem mostrar fêmeas copulando com diversos machos, a análise genética permite visualizar se houve, ou não, a fertilização dessas (Page & Metcalf 1982) e se essa fertilização levou à produção de machos diplóides. Assim, a ação conjunta dessas metodologias, como visto, permitirá interpretar com maior segurança e consistência os achados sobre o sistema de acasalamento que se observa a campo e os acasalamentos extra-par que a estrutura genética do ninho parece sugerir.

## 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nesta Dissertação, são descritas informações referentes à biologia de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*, uma espécie que, diferentemente da maioria das outras espécies já estudadas do gênero, não nidifica em ninhos armadilhas, mas constrói seus próprios ninhos com barro. Todo esse processo foi acompanhado, registrado, fotografado e filmado. Comparação entre duas populações, São Carlos e Araras, foi feita, assim como com outras espécies de *Trypoxylon* que constroem seus ninhos (*T. politum*, *T. monteverdeae*, *T. antropovi* e *T. aestivale*). A marcação de indivíduos adultos não foi bem sucedida; porém, novos esforços devem ser feitos para que detalhes de comportamento sejam melhor visualizados (cópulas extra-par, tanto da fêmea nidificadora quanto do macho-guarda, trocas de machos-guarda e alternância de estratégia dos machos entre guarda e patrulheiro), além da quantificação do número de gerações presentes em um ano e a longevidade dos adultos. Maior atividade de nidificação na época fria e seca do ano e assincronia entre nidificação e emergência de adultos ainda não haviam sido descritas para essas vespas. Todavia, informações como a ocorrência de quiescência das larvas, aparente multivoltismo e identificação das presas e dos parasitóides irão complementar o que já vem sendo estudado nesse gênero. Este trabalho também traz novas evidências de que há maior pressão de seleção nas fêmeas do que nos machos, através de análises do tempo de desenvolvimento, da massa corpórea e da alocação de recursos. A fim de aumentar a robustez das informações sobre investimento parental e herdabilidade, dados de casais adultos devem ser obtidos e contrapostos aos de suas proles.

Oito regiões de microssatélites foram prospectadas e analisadas, sendo quatro polimórficas e suficientemente informativas para esse estudo do sistema de acasalamento e paternidade em *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse*. Os marcadores desenvolvidos também amplificaram para outras espécies, tanto do subgênero *Trypargilum* quanto de *Trypoxylon*.

Estas são as primeiras informações genéticas utilizando microsatélites e vislumbram uma nova perspectiva para as pesquisas com esse gênero, principalmente no que se refere à paternidade das crias de um ninho recair sobre o macho que o guardou. No entanto, é recomendável que novas regiões polimórficas de microsatélites e de DNA mitocondrial sejam encontradas e utilizadas para aumentar a robustez das análises e trazer novas informações, como estruturação populacional, expansão, colonização, taxa de endogamia, dispersão e filopatria, inclusive em outras espécies de *Trypoxylon*.

Nas duas populações estudadas foram encontrados machos diplóides; no entanto, estes não parecem ser consequência de cruzamentos entre aparentados, causado por populações pequenas e endogâmicas (as populações se encontram em equilíbrio genético para os locos analisados), apesar de análises mais específicas serem necessárias para confirmação. Eles parecem ser consequência da poliandria das fêmeas, as quais se acasalam com diversos machos, sendo que alguns deles possuem o mesmo alelo para o loco sexual que elas. As informações genéticas dessa dissertação também permitiram retomar, com novos argumentos, a discussão sobre a origem evolutiva do comportamento de guarda do macho encontrado em alguns insetos. Informações genéticas adicionais sobre o sistema de acasalamento desses insetos são necessárias, principalmente entre os subgêneros *Trypargilum* e *Trypoxylon*, para que a hipótese da monogamia genética por ninho seja testada. Informações sobre a morfologia do aparelho reprodutor também se fazem necessárias, pois já é sabido que a espermateca de espécies do subgênero *Trypargilum* é menor do que de fêmeas do subgênero *Trypoxylon* (Moreira 2007) e que isso pode ter relação com o sistema de acasalamento desses subgêneros.



## 7- BIBLIOGRAFIA

- Alcock, J. Adaptive mate-guarding by males of *Ontholestes cingulatus* (Coleoptera: Staphylinidae). **Journal of Insect Behavior**. 4(6): 763-771. 1991.
- Amarante, S. T. P. **Biologia e comportamento reprodutivo de *Trypoxylon (Trypargilum) albitarse* F. (Hymenoptera: Sphecidae)**. Dissertação de Mestrado. USP - São Paulo. 109p. 1991.
- Banks, D. Male nest defense in the digger wasp *Cerceris binodis* (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of Hymenoptera Research**. 4: 77-79. 1995.
- Brockmann, H. J. Diversity in the nesting behaviour of mud-daubers (*Trypoxylon politum* Say; Sphecidae). **Florida Entomologist**. 63: 53-64. 1980.
- Brockmann, H. J. Male behavior, courtship and nesting in *Trypoxylon (Trypargilum) monteverdeae* (Hymenoptera: Sphecidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**. 65: 66-84. 1992.
- Brockmann, H. J.; Grafen, A. Mate conflict and male behaviour in a solitary wasp, *Trypoxylon (Trypargilum) politum*. **Animal Behaviour**. 37: 232-255. 1989.
- Brockmann, H. J.; Grafen, A. Sex ratios and life-history patterns of a solitary wasp, *Trypoxylon (Trypargilum) politum* (Hymenoptera:Sphecidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**. 30(1): 7-27. 1992.
- Buschini, M. L. T.; Wolf, L. L. Notes on the biology of *Trypoxylon (Trypargilum) opacum* Bréthes (Hymenoptera; Crabronidae) in southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. 66: 915-926. 2006.
- Camillo, E. Bionomics of *Trypoxylon (Trypargilum) antropovi* and *Trypoxylon (Trypargilum) aestivale* (Hymenoptera: Sphecidae). **Iheringia**. 87: 29-36. 1999.

- Camillo, E.; Garófalo, C. A.; Muccillo, G.; Serrano, J. C. Biological observation on *Trypoxylon (Trypargilum) lactitarse* Saussure in Southeastern Brazil (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 37: 769-778. 1993.
- Camillo, E.; Garófalo, C. A.; Serrano, J. C. Observações sobre a biologia de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 23: 299-310. 1994.
- Camillo, E.; Brescovit, A. D. Aspectos biológicos de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae) em ninhos-armadilhas, com especial referência a suas presas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 28(2): 251-262. 1999.
- Charnov, E. L. **The theory of the sex allocation**. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 355p. 1982.
- Coville, R. E. **Wasps of the genus *Trypoxylon* subgenus *Trypargilum* in North America**. University of California Press. 147p. 1982.
- Coville, R. E.; Coville, P. L. Nesting biology and male behaviour of *Trypoxylon (Trypargilum) tenocitlan* in Costa Rica (Hymenoptera: Sphecidae) **Annals of the Entomological Society of America**. 73: 110-119. 1980.
- Evans, H. E.; Eberhard, M. J. W. **The Wasps**. The university of Michigan Press. 265p. 1970.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider S. Arlequin v. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 1: 47-50. 2005.
- Falconer, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. 3a ed. New York: Longman. 389p. 1989.
- Fernandes-Salomão, T. M.; Rocha, R. B.; Campos, L. A. O.; Araújo, E. E. The first internal transcribed spacer (ITS-1) from *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini): characterization and phylogenetic analysis. **Insectes Sociaux**. 52: 11-18. 2005.
- Fisher, R. A. **The genetical theory of natural selection**. Oxford. Clarendon Press. 230p. 1930.

- Flanders, S. E. The mechanism of sex-ratio regulation in the (parasitic) Hymenoptera. **Insectes Sociaux**. 3: 325-334. 1956.
- Freeman, B. Parental investment, maternal size, and population dynamics in a solitary wasp. **American Naturalist**. 117: 357-362. 1981.
- Freitas, P. D.; Martins D. S.; Galleti Jr P. M. CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. **Molecular Ecology Resources**. 8(1): 107-108. 2008.
- Garcia, M. V. B.; Adis, J. Comportamento de nidificação de *Trypoxylon (Trypargilum) rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae) em uma floresta inundável de várzea na Amazônia Central. **Amazoniana**. 13: 259-282. 1995.
- Gauld, I.; Bolton, B. **The Hymenoptera**. Oxford University Press. Oxford, UK. 332p. 1996.
- Gerber, H. S.; Klostermeyer, E. C. Sex control by bees: a voluntary act of egg fertilization during ovipositing. **Science**. 167: 82-84. 1970.
- Grafen, A. Opportunity, cost, benefit and degree of relatedness. **Animal Behaviour**. 28: 967-968. 1980.
- Hamilton, W.D. The genetical evolution of social behaviour. **Journal of Theoretical Biology**. 7: 1-52. 1964.
- Hamilton, M. B.; Pincus, E. L.; Di Fiori, A.; Flesher, R. C. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques**. 27: 500-507. 1999.
- Hasselmann, M.; Gempe, T.; Schiøtt, M.; Nunes-Silva, C. G.; Otte, M.; Beye, M. Evidence for the evolutionary nascence of novel sex determination pathway in the honeybees. **Nature**. 454: 519-522. 2008.

- Havron, A.; Rosen, D.; Rossler, Y. A nest method for pesticide tolerance in minute parasitic Hymenoptera. **Entomophaga**. 32: 83-95. 1987.
- Heimpel, G. E.; de Boer, J. G. Sex determination in the Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**. 53: 209-230. 2008.
- Hook, A. W.; Matthews, R. W. Nesting biology of *Oxybelus sericeus* with a discussion of nest guarding by male sphecidae wasps (Hymenoptera). **Psyche**. 87: 21-37. 1980.
- Hughes, C. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: A revolution results. **Ecology**. 79(2): 383-399. 1998.
- Kaltenpoth, M., Strohm, E., Gadau, J. Polymorphic microsatellite markers for a solitary digger wasp, the European beewolf (*Philanthus triangulum*; Hymenoptera, Sphecidae). **Molecular Ecology Notes**. 4(4): 589-592. 2004.
- Loyola, R. D.; Martins, R. P. Trap-nest occupation by solitary wasps and bees (Hymenoptera: Aculeata) in a forest urban remnant. **Neotropical Entomology**. 35(1): 41-48. 2006.
- Lucas, E. R., Horsburgh, G. J., Dawson, D. A., Field, J. Characterization of microsatellite loci isolated from the wasp, *Microstigma nigrophthalmus* (Hymenoptera). **Molecular Ecology Resources**. 9(6): 1492-1497. 2009.
- Melo, G. A. R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera): with emphasis on the crabronid wasps. **Scientific Papers of the University of Kansas Natural History Museum**. 14: 1-55. 1999.
- Michener, C. D. **The social behavior of the bees. A comparative study**. Cambridge. The Belknap Press. 404p. 1974.
- Moilanen, A.; Sundström, L.; Pedersen, J. S. MATESOFT: a program for genetic analysis of mating systems 1.0. Institute of Biology, University of Copenhagen, Copenhagen. Disponível em < <http://www.bi.ku.dk/staff/JSPedersen/MateSoft/>>. 2004.

- Molumby, A. Why make daughters larger? Maternal sex-allocation and sex-dependent selection for body size in a mass-provisioning wasp, *Trypoxylon politum*. **Behavioral Ecology**. 8: 279-287. 1996.
- Moreira, P. A. **Morfologia do sistema reprodutor masculino e aspectos do comportamento reprodutivo de *Trypoxylon (Trypargilum)* (Hymenoptera: Crabronidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa – Viçosa. 39p. 2007.
- Oku, S.; Nishida, T. Factors affecting female-biased sex ratio in trap-nesting wasp, *Trypoxylon malaisei*. **Researches on Population Ecology**. 41: 169-175. 1999.
- Page, R. E. Jr.; Metcalf, R. A. Multiple mating, sperm utilization, and social evolution. **American Naturalist**. 119: 263-281. 1982.
- Peakall, R.; Smouse, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**. 6: 288-295. 2006.
- Peckham, D. J.. Reduction of miltogrammine cleptoparasitism by male *Oxybelus subulatus* (Hymenoptera: Sphecidae). **Annals of the Entomological Society of America**. 70(6): 823-828. 1977.
- Peruquetti, R C. **Aspectos da biologia, estrutura populacional e parentesco intranidal em vespas do gênero *Trypoxylon* (Hymenoptera: Sphecidae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos – São Carlos. 59p. 2003.
- Peruquetti, R. C.; Del Lama, M. A. Alocação sexual e seleção sexo-dependente para tamanho de corpo em *Trypoxylon rogenhoferi* Kohl (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 47(4): 581-588. 2003a.
- Peruquetti, R. C.; Del Lama, M. A. Notas sobre a socialidade e a biologia de nidificação de *Trypoxylon (Trypoxylon) asuncicola* Strand, 1910 (Hymenoptera, Sphecidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 47: 297–301. 2003b.

- Queller, D. C., Strassmann, J. E., Hughes, C. R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology and Evolution**. 8: 285-288. 1993.
- Richards, O. W. **The American species of the genus *Trypoxylon***. Transactions of the Royal Entomological Society of London. 82: 173–362. 1934.
- Ross, K. G.; Matthews, R. W. **The social biology of wasps**. Londres. Cornell university Press. 678p. 1991.
- Sandhouse, G. A. A review of the nearctic wasps of the genus *Trypoxylon* (Hymenoptera: Sphecidae). **American Midland Naturalist**. 24(1): 133-176. 1940.
- Santoni, M. M. **Biologia de nidificação e Estrutura Sociogenética Intranidal em Espécies de *Trypoxylon* (Hymenoptera: Crabronidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos – São Carlos. 152p. 2008.
- Santoni, M. M., Del Lama, M. A. Nesting biology of the trap-nesting Neotropical wasp *Trypoxylon (Trypargilum) aurifrons* Shuckard (Hymenoptera, Crabronidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 51(3): 369-376. 2007.
- Santoni, M. M.; Brescovit, A. D.; Del Lama, M. A. Ocupação diferencial do habitat por vespas do gênero *Trypoxylon (Trypargilum)* Latreille (Hymenoptera, Crabronidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 53(1): 107-114. 2009.
- Smith, R. **Sperm competition and the evolution of animal mating systems**. 1ªed. California. Academic Press. Inc. 687p. 1984.
- Thornhill, R.; Alcock, J. **The evolution of insect mating systems**. 1ªed. Cambridge. Harvard University Press. 547p. 1983.
- Tormos, J.; Asís, J. D.; Gayubo, S. F.; Calvo J.; Martín, M. A. Ecology of Crabronid wasps found in trap nest from Spain (Hymenoptera: Spheciforme). **Florida Entomologist**. 88(3): 278-284. 2005.

- Trivers, R. I.; Hare, H. Haplodiploidy and the evolution of social insects. **Science**. 191: 249-263. 1976.
- Tsuji, N.; Yamamura, N. An ESS model of postcopulatory guarding: A case of multi-copulation during oviposition. **Acta Eruditorum of Saga Medical School**. 4: 45-61. 1986.
- van Wilgenburg, E.; Driessen, G.; Beukeboom, L. W. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design?. **Frontiers in Zoology**. 3:1. 2006.
- Waage, J. K. Dual function of the damselfly penis: Sperm removal and transfer. **Science**. 203: 916-918. 1979.
- Walker, W. F. Sperm utilization strategies in nonsocial insects. **American Naturalist**. 115: 780-799. 1980.
- Wilson, E. O. **The insect societies**. Cambridge. Harvard University Press. 548p. 1971.
- Zar, J. H. **Biostatistical analysis**. London. Prentice Hall. 663p. 1999.