



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WELBER DA COSTA PINA

**UMA ABORDAGEM COMPORTAMENTAL, GENÉTICA E
QUÍMICA DE *EPICCHARIS DEJEANII* (APIDAE: CENTRIDINI)
NIDIFICANDO EM AGREGAÇÃO**

Londrina
2021

WELBER DA COSTA PINA

**UMA ABORDAGEM COMPORTAMENTAL, GENÉTICA E
QUÍMICA DE *EPICCHARIS DEJEANII* (APIDAE: CENTRIDINI)
NIDIFICANDO EM AGREGAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr^a. Silvia Helena Sofia.
Coorientador: Prof. Dr^a. Lenice Souza-Shibatta.

Londrina
2021

Pina, Welber da Costa.

UMA ABORDAGEM COMPORTAMENTAL, GENÉTICA E QUÍMICA DE
EPICHARIS DEJEANII (APIDAE: CENTRIDINI) NIDIFICANDO EM AGREGAÇÃO /
Welber da Costa Pina. -

Londrina, 2021.

88 f.

Orientador: Silvia Helena Sofia. Coorientador:
Lenice Souza-Shibatta.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,
2021.

Inclui bibliografia.

1. Abelha Neotropical - Tese. 2. Comportamento de acasalamento - Tese. 3.
Hidrocarbonetos cuticulares - Tese. 4. Marcadores microssatélites - Tese. I. Helena
Sofia, Silvia. II. Souza-Shibatta, Lenice. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

WELBER DA COSTA PINA

**UMA ABORDAGEM COMPORTAMENTAL, GENÉTICA E
QUÍMICA DE *EPICCHARIS DEJEANII* (APIDAE: CENTRIDINI)
NIDIFICANDO EM AGREGAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof. Dr^a. Silvia Helena Sofia

Coorientadora: Prof. Dr^a. Lenice Souza-Shibatta

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Gaglianone
Universidade Estadual do Norte Fluminense –
UENF

Prof. Dr. Léo Correia da Rocha Filho
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Prof^a. Dr^a. Gabriele Antico Freiria
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de fevereiro de 2021.

Dedico este trabalho a meu filho Benício e a meu avô Salu (*In memoriam*), que são minhas fontes inspiradoras de vida, luz e esperança...

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia, por ter me auxiliado durante todo o curso desta pesquisa, sempre disposta a ajudar e a me orientar. Obrigado por todos os momentos de conselhos, conversas e puxões de orelhas que foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal.

À Dr^a Lenice Souza-Shibatta pela coorientação e, também, pela ajuda, amizade, carinho e cumplicidade que sempre teve comigo. Você foi fundamental para avanços e concretização desta tese! Sempre terá meu reconhecimento.

À Universidade do Estado da Bahia (UNEB), em especial ao Colegiado de Biologia e ao prof. Dr. Marcelo Madureira por permitir e viabilizar a realização desse sonho. Marcelo, serei sempre grato pelo que fizeste.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), pelo suporte logístico e infra-estrutura, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UEL e à Secretária Nazária Bertola Duarte por toda atenção dispensada.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade e ao Parque Nacional do Superagui, em especial a Raphael, por todo o suporte durante as coletas na ilha.

Ao Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras na Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, especialmente à Amanda Prato e ao prof. Dr Fábio S. Nascimento pela valiosa ajuda nas análises dos hidrocarbonetos cuticulares

Ao Laboratório Multiusuário de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM) da UEL, em especial à Dra. Sara Godoy e a técnica Cristina Ap. Lopes, pela ajuda no sequenciamento e nas análises químicas.

Aos amigos, Natalia Uemura e André L. Gobatto, pelas conversas, distrações, risadas, agonias mútuas, discussões, ajuda no campo e dicas importantes para este estudo.

Ao pessoal do Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA) da UEL: à Caroline Silva, Thais Kotelok-Diniz e Wilson Frantine pelos ensinamentos e ajuda nas análises genéticas. À Camila Savada pelo suporte na elaboração de

figura e dicas essenciais na genotipagem. A Robson Rockembacher, Susanna Miranda e Natália Held pela ajuda de campo. Enfim, agradeço a todos do LAGEA pela boa convivência e por fazer o momento de trabalho ser tão mais agradável e divertido.

À Dr^a Gabriele Antico Freiria pela participação na elaboração do projeto, ajuda e suporte na genética das abelhas. Ainda, pelas dicas e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Paulo C. Ricardo, à Dr^a. Maria C. Gaglianone e à Dr^a Maria C. Arias pelo suporte no desenvolvimento dos microssatélites.

Ao amigo prof. Dr. David Lucas Rohr pelas distrações, convivência, conversas e dicas na melhoria do trabalho final.

Ao colega doutorando Felipe Camurugi pelo suporte nas análises estatísticas.

Ao Dr. José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro pela identificação das espécies de plantas coletadas.

Com admiração e gratidão que agradeço às professoras Dr^a Raquel Perez-Maluf e Dr^a Cândida Maria Lima Aguiar, que sempre me instruíram e incentivaram na busca da realização desse sonho. Acredito que vocês fazem parte desta vitória.

A “família londrinense da casa azul”: Lina, Vanessa, Fabiana, Írio, Felipe, Antônio, Mateus, Eduardo, Felipe, Emerson, Dreiphus e Carlos pela ótima convivência, pelos momentos divertidos, alegres e engraçados que passamos juntos! Além disso, espero que os momentos de aprendizagens e ensinamentos desses anos de convivência sejam sempre lembrados.

Agradeço também a todos os professores do curso e aqueles que estiveram presentes em minha trajetória.

Agradeço a minha querida família pelo apoio incondicional e pela concretização desse sonho: minha mãe (Elenice), meu tio (Florentino), minha avó (Altina), meus irmãos (Rogério e Marcelo) e a meus lindos sobrinhos (Victor, Alice, Maria, Raphael, Catarina). Vocês constituem uma família que é o maior orgulho de minha vida. Amo-os.

À Ariane, pelo apoio, carinho, paciência, amizade, amor e companheirismo. Sempre esteve presente nos momentos mais delicados e estressantes; sua presença e compreensão foram fundamentais para essa longa

jornada que se finda. Obrigado por tudo!

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

“VIDAS NEGRAS IMPORTAM!”

PINA, Welber da Costa. **Uma abordagem comportamental, genética e química de *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini) nidificando em agregação**. 2021. 61 f + xxi. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

São escassas as informações sobre a biologia de nidificação de abelhas solitárias neotropicais, que constroem ninhos em agregação, especialmente sobre os mecanismos comportamentais, químicos e genéticos envolvidos no reconhecimento de parceiros para o acasalamento. Neste sentido, abordagens integrando diferentes metodologias podem constituir ferramentas valiosas na busca de informações sobre mecanismos de reconhecimento de parceiros em abelhas que nidificam em agregações. *Epicharis dejeanii* é uma espécie solitária, neotropical, protândrica, com ciclo de vida univoltino e hábito de nidificar em agregações. Neste estudo, descrevemos o comportamento de acasalamento e avaliamos as estratégias reprodutivas empregadas por machos durante o período reprodutivo de *E. dejeanii* nidificando em uma grande agregação. Além disso, empregamos análises dos hidrocarbonetos cuticulares (HCs) juntamente com marcadores moleculares genéticos para investigar o possível papel dos HCs no mecanismo de sinalização do reconhecimento químico entre indivíduos e parentesco genéticos entre estes, respectivamente. Espécimes de *E. dejeanii* foram amostrados, na Ilha do Superagui, no sul do Brasil, durante duas estações reprodutivas consecutivas (novembro/dezembro de 2017 e 2018). As observações sobre o comportamento de acasalamento e as patrulhas dos machos foram realizadas durante 37 dias, das 6 às 18h, entre novembro e dezembro desses anos. Durante as coletas, machos patrulhando e/ou copulando foram coletados e utilizados para medidas morfométricas. Nas análises genéticas, 45 machos e 35 fêmeas (80 indivíduos) foram genotipados para 12 locos microssatélites. Adicionalmente, caracterizou-se os HCs destes indivíduos, por meio de um sistema de cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massa. Os machos foram ativos apenas em novembro/dezembro e apresentaram duas táticas de patrulha por acasalamento: i) sobrevoos próximos ao solo (ii) voos sobre árvores (em alturas de aproximadamente 2,5 m e distantes cerca de 2 a 5 m da agregação de nidificação). As análises morfométricas revelaram uma maior largura da cabeça e distância intertegular entre os machos que patrulham acima das plantas, oposto ao observado para algumas espécies de *Centris*, sugerindo que a estratégia adotada tem associação com o tamanho corporal dos machos. No entanto, ambas as estratégias foram eficazes no sucesso da cópula. Os machos demonstraram um pico de atividade no patrulhamento em busca de fêmeas entre 9h e 11h:30, coincidente com o período de maior emergência de fêmeas e maior número de acasalamentos. Os dados moleculares revelaram altos níveis de diversidade genética, sugerindo baixo nível de endogamia na população da agregação. As análises genéticas também demonstraram ausência de parentesco entre os machos e fêmeas de seis casais que foram coletados durante o processo de cópula. Os resultados também indicaram que, enquanto variações quantitativas e qualitativas dos HCs permitiram diferenciar os sexos dos indivíduos e fêmeas virgens das já acasaladas, nenhuma distinção nos HCs foi observada entre machos que empregavam diferentes tipos de estratégias de buscas por fêmea. Por outro

lado, a análise do perfil de HCs, entre parentes e não parentes, demonstrou que os compostos cuticulares avaliados permitem a distinção entre os grupos. Os resultados obtidos indicam que os HCs são potencialmente importantes podendo atuar no reconhecimento de parentes em *E. dejeanii* prevenindo a depressão por endogamia do agregado..

Palavras-chave: abelha neotropical; agregação de ninhos; comportamento de acasalamento; hidrocarbonetos cuticulares; marcadores microssatélites.

PINA, Welber da Costa. **A behavioral, genetic and chemical approach of the *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini) nesting in aggregation.** 2021. 61 p + xxi. Thesis (Doctorate degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

There is little information on the nesting biology of solitary neotropical bees that build nests in aggregation. Little is known especially about the mechanisms behavioral, chemical and genetic involved in the recognition of mating partners. In this sense, approaches integrating different methodologies could be valuable tools in the search for information on mechanisms for recognizing partners in bees that nest in aggregations. *Epicharis dejeanii* is a species of solitary, Neotropical, protandric bee, with a univoltine life cycle and which has the habit of nesting in aggregations. In this study, was described describe the mating behavior and evaluate the reproductive strategies employed by the males during the reproductive period of *E. dejeanii* nesting in a large aggregation. In addition, it used to analyze cuticular hydrocarbons (HCs) together with genetic molecular markers to investigate the possible role of HCs in the signaling mechanism of chemical recognition between individuals and genetic kinship between them, respectively. Thus, individuals of this species were sampled on the Island of Superagui, in southern Brazil, during two consecutive breeding seasons (November/December 2017 and 2018). Observations on mating behavior and male patrols were carried out for 37 days, from 6:00 am to 6:00 pm, between November and December of those years. During sampling, males patrolling and / or copulating with females of *E. dejeanii* were collected and used for morphometric measurements. In the genetic analyses, 45 males and 35 females (80 individuals) were genotyped for 12 microsatellite loci. Additionally, the HCs of these individuals were characterized by means of a gas chromatography system coupled to mass spectrometry. Males were active only in November/December and presented two mating patrol tactics: i) flyover near the ground and (ii) flights over trees (at heights of approximately 2.5m and approximately 2 to 5m from nesting aggregates). Morphometric analyses revealed a greater head width and intertegular distance among males patrolling above plants, opposite to that observed for *Centris* species, suggesting that the adopted patrol strategy has an association with the body size of males. However, both strategies were effective in copulation success. Males showed a peak of activity on patrol in search of females between 9:00 and 11:30 hours, which coincided with the period of greatest emergence of females, and when the highest number of matings was observed. The molecular data revealed high levels of genetic diversity, suggesting a low level of inbreeding in the population of the aggregation. Genetic analyzes also demonstrated an absence of kinship between the males and females of six couples that were collected during the copulation process. The results also indicated that, while quantitative and qualitative variations in CHCs allowed to differentiating the sexes of individuals and virgin females from those already mated, no distinction in the CHCs between males employing different types strategic of searches female was observed in the analyzes. On the other hand, the analysis of the profile of CHCs between relatives and non-relatives demonstrated that the cuticular compounds evaluated are capable of allowing the distinction between groups. The results obtained indicate that CHCs are potentially important and may

act in the recognition of relatives in *E. dejeanii* preventing depression by inbreeding of the aggregate.

Keywords: neotropical bee; nest aggregation; mating behavior; cuticular hydrocarbons; microsatellites markers.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** – Medidas de temperatura média (C), número total (abundância) de machos de *Epicharis dejeanii* coletados e número de fêmeas emergentes (amostradas em diferentes horários do dia, durante dez dias de amostragem não consecutivos) na Ilha do Superagui, Guaraqueçaba, Paraná, sul do Brasil. O número acima da barra indica o número de fêmeas emergidas 21
- Figura 2** – Média das medidas morfométricas (mm), (A) largura da cabeça e (B) distância intertegular, obtidas para os dois grupos de machos de *Epicharis dejeanii* analisados: patrulheiros de árvore e solo. As barras representam o desvio padrão. Cada grupo consistia em 18 machos 22
- Figura 3** – Uma sequência do acasalamento em *Epicharis dejeanii* (A–F) em uma área de restinga na Ilha do Superagui. (A) macho tentando imobilizar a fêmea, usando suas pernas; (B) fêmea procura um substrato (galho) para agarrar com suas pernas; (C) fêmea agarra o substrato com as pernas e mandíbulas; (D) a fêmea solta o galho; (E) e (F) fim do acasalamento, macho solta a fêmea se soltando 23

Capítulo 2

- Figura 2** - Análise de componentes principais (PCO) realizada com hidrocarbonetos cuticulares da abelha *E. dejeanii* (quadrados pretos = machos patrulhadores de plantas; quadrados cinzas = machos patrulhadores de solo; triângulos pretos = fêmeas nidificando; triângulos cinzas sem preenchimentos = fêmeas virgens emergentes; triângulos cinzas = fêmeas recém acasaladas)..... 40
- Figura 2** – Proporção (%) dos compostos de hidrocarbonetos separados por classe para cada grupo da abelha solitária *E. dejeanii*..... 40
- Figura 3** – Distância (Euclidiana) de similaridade dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares entre os grupos de fêmeas da

abelha *E. dejeanii* (Fêmeas aparentadas = fêmeas com probabilidade $\geq 50\%$ de serem parentes; fêmeas não aparentadas = fêmeas com probabilidade $\leq 1\%$ de serem parentes; barra representa o desvio padrão; * = diferença significativa) 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão da proporção relativa de hidrocarbonetos de <i>Epicharis dejeanii</i> . (MPP = machos patrulhadores de plantas; MPS = machos patrulhadores de solo; FNI = fêmeas nidificando; FVE = fêmeas virgens emergentes; FRA = fêmeas recém acasaladas; (n) = alcanos; (z) = alcenos; (zz) = alcadienos; (a,b) = local da dupla ligação indefinido)	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IPARDES	Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social
LAGEA	Laboratório de Genética e Ecologia Animal
LAMM	Laboratório Multiusuário de Análise de Materiais e Moléculas
LACEIS	Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	01
2	INTRODUÇÃO GERAL	03
2.1	OBJETIVO GERAL	10
2.2	HIPÓTESES	10
2.2	QUESTÕES NORTEADORAS.....	11
2.3	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
3	CAPÍTULO 1. MALES STRATEGIES AND MATING BEHAVIOR IN THE NEOTROPICAL BEE <i>Epicharis</i> (<i>Anepicharis</i>) <i>dejeanii</i> (Apidae: Centridini)	18
3.1	INTRODUCTION	19
3.2	MATERIALS AND METHODS	20
3.2.1	Characterization of the Study Area.....	20
3.2.2	The Aggregation.....	20
3.2.3	Behavioral Analyses.....	21
3.2.4	Morphological Analyses	21
3.3	RESULTS.....	21
3.3.1	Males Patrolling Behavior.....	21
3.3.2	Emergences	21
3.3.3	Morphometric Analyses.....	21
3.3.4	Mating Behavior	21
3.4	DISCUSSION	22
3.4.1	Male Patrol Behavior.....	22
3.4.2	Mating Behavior	24
3.5	ACKNOWLEDGEMENTS	24
3.6	DISCLOSURE STATEMENT	25
3.7	FUNDING.....	25
3.8	SUPPLEMENTARY MATERIAL	25
3.9	REFERENCES	25
4	CAPÍTULO 2. ANÁLISE INTEGRADA GENÉTICA E DOS	

	HIDROCARBONETOS CUTICULARES DESVENDA ASPECTOS DO PROCESSO REPRODUTIVO DA ABELHA SOLITÁRIA NEOTROPICAL <i>Epicharis dejeanii</i> (Apidae: Centridini), UMA ABELHA SOLITÁRIA	28
4.1	RESUMO	29
4.2	INTRODUÇÃO	30
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.3.1	Área de Estudo.....	34
4.3.2	Análises Químicas.....	34
4.3.3	Análises Genéticas.....	35
4.3.4	Análise dos Dados	36
4.4	RESULTADOS	38
4.5	DISCUSSÃO.....	42
4.6	AGRADECIMENTOS.....	47
4.7	REFERÊNCIAS.....	48
5	CONCLUSÃO GERAL	57
6	APÊNDICES	58
6.1	Apêndice A - Análise da espectrometria de massa da abelha <i>Epicharis dejeanii</i>	59
6.2	Apêndice B - Caracterização dos locos da população	60
6.3.	Apêndice C - informações sobre a descrição de locos microssatélites para a espécie <i>Epicharis dejeanii</i>	61
7	ANEXO – DIRETRIZES PARA AUTORES DA REVISTA “ZOOLOGICAL JOURNAL OF LINNEAN SOCIETY”	xviii

1. APRESENTAÇÃO

A ideia central desta tese surgiu em 2017, a partir de discussões e inquietações sobre o estudo que investigava o comportamento de nidificação das fêmeas de *Epicharis dejeanii*, em uma agregação que ocupa uma área aproximada de 2.000 m² e reúne centenas de ninhos, na Ilha do Superagui/PR. Essa agregação foi identificada em novembro de 2013 e, a partir de 2014, vem sendo monitorada e analisada pela equipe do Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA) da UEL.

Embora importantes aspectos comportamentais e da biologia de nidificação de *E. dejeanii* tivessem sido descritos, outras indagações permaneciam sem respostas como, por exemplo, quando e como os machos patrulham? Os machos têm a capacidade de patrulhar em locais específicos, gerando territórios no agregado? Existe algum sistema de reconhecimento de parentes para evitar a endogamia e possibilita a persistência deste tipo de nidificação na natureza? Deste modo, com o propósito de solucionar lacunas sobre o sistema de acasalamento de abelhas solitárias neotropicais, o principal objetivo desta tese foi investigar a possível existência de um sistema de reconhecimento entre parentes para evitar o colapso da população pela depressão endogâmica. O estudo envolveu observações do comportamento dos machos em uma agregação de ninhos da espécie *E. dejeanii* e análises genéticas e químicas, envolvendo marcadores microssatélites e análises de hidrocarbonetos cuticulares, respectivamente.

Os resultados deste trabalho estão apresentados em dois capítulos, além de de uma introdução geral, que aborda alguns aspectos da biologia do gênero *Epicharis*, sobre os marcadores microssatélites, os hidrocarbonetos cuticulares e suas respectivas aplicações em estudos com abelhas com interesse na determinação de parentesco, na discriminação entre indivíduos, sexos e parceiros sexuais.

O Capítulo 1, intitulado “Male strategies and mating behavior in the Neotropical bee *Epicharis (Anepicharis) dejeanii* (Apidae: Centridini)”, descreve o comportamento de acasalamento de *Epicharis dejeanii* e apresenta as estratégias reprodutivas empregadas pelos machos durante o período reprodutivo em uma área contendo a agregação de ninhos desta espécie. Este trabalho foi publicado (online) no periódico *Journal of Apicultural Research*, em março de 2020.

O Capítulo 2, intitulado “Uma análise integrada genética e dos hidrocarbonetos cuticulares desvenda aspectos do processo reprodutivo de *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini), uma abelha solitária”, apresenta os resultados referentes as análises de microssatélites e dos hidrocarbonetos cuticulares, que envolveram indivíduos machos e fêmeas da agregação de ninhos, para a obtenção de informações genéticas e sinalização química que propiciam o reconhecimento de indivíduos aparentados, o sexo e o *status* reprodutivo da fêmea.

2. INTRODUÇÃO GERAL

A tribo Centridini é um dos mais diversos grupos de abelhas da região Neotropical (MICHENER, 2007). A posição filogenética de Centridini, dentro da linhagem Apidae, tem gerado controvérsias sobre sua monofilia e vem sendo debatida. A classificação tradicional, que usa caracteres morfológicos, suporta *Centris* Fabricius 1804 e *Epicharis* Klug 1807 como grupos-irmãos (ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993), provavelmente devido aos caracteres relacionados ao comportamento de coleta de óleo. Entretanto, estudos utilizando caracteres moleculares sugerem a parafilia da tribo, mostrando *Epicharis* como grupo-irmão de um clado compreendendo *Centris* e as abelhas corbiculadas (CARDINAL et al., 2010; MARTINS & MELO, 2016). Contudo, os gêneros *Centris* e *Epicharis* são consistentemente monofilético em todas as análises (ROIG-ALSINA & MICHENER, 1993; CARDINAL et al., 2010; MARTINS & MELO, 2016).

Centris é um gênero mais diverso, com cerca de 230 espécies, amplamente distribuído pelas Américas (MICHENER, 2007), enquanto *Epicharis* possui atualmente 35 espécies catalogadas e apresenta distribuição exclusiva aos neotrópicos (MOURE et al., 2012). Estes dois gêneros são de abelhas solitárias, de tamanho médio a grande, robustas, 'pilosas' e que voam muito rápido (MICHENER, 2007). Grande parte das espécies constroem seus ninhos no solo, em barrancos ou no solo plano (AGUIAR & GAGLIANONE, 2003) e algumas delas usam cavidades preexistentes em madeira morta para nidificação (COVILLE et al., 1983; FRANKIE et al., 1993).

A maioria das fêmeas das espécies de *Centris* e todas de *Epicharis*, além de visitarem as plantas para coleta de pólen e néctar, apresentam nas pernas estruturas morfológicas especializadas para a coleta, manuseio e transporte de óleo floral (VOGEL, 1974; NEFF & SIMPSON, 1981). Esses óleos são usados como material de construção e de impermeabilização das células de cria (VINSON et al., 1996). Além disso, estudos recentes sugerem que os óleos florais podem fornecer proteção contra cleptoparasitas (NEFF & SIMPSON, 2017). Enquanto *Centris* visita uma ampla gama das famílias de angiospermas produtoras de óleo, *Epicharis* coleta óleo apenas em Malpighiaceae (ALVES-DOS-SANTOS et al., 2007).

As 35 espécies de *Epicharis* são abelhas solitárias, distribuídas em nove subgêneros, com ocorrência nas Américas do Sul e Central, e com registro também

para o México (MOURE et al., 2012). No Brasil, espécies deste gênero foram registradas em diversos ambientes, como na Mata Atlântica, Cerrado, Florestas Amazônica, em formações vegetais de campos e em áreas antrópicas (GAGLIANONE, 2001). Além de serem visitantes de várias famílias de angiospermas (MACHADO, 2004) em ecossistemas naturais, várias espécies de *Epicharis* têm sido reconhecidas como importantes polinizadores de diferentes culturas agrícolas (GAGLIANONE et al., 2010; VILHENA et al., 2012; GIANNINI et al., 2015) e de espécies de plantas nativas (DUNLEY et al., 2009; SAZAN et al., 2014).

As fêmeas de *Epicharis* cavam buracos no solo, especialmente arenosos, para construção dos ninhos (GAGLIANONE, 2005) e algumas espécies podem formar grandes agregações (ROUBIK & MICHENER, 1980; HILLER & WITTMANN, 1994; INOUE, 2000). Estudos em *Epicharis* são direcionados para aspectos sobre sazonalidade, biologia de nidificação, inimigos naturais e as fontes de recursos utilizadas para a alimentação da sua prole em algumas espécies, como em *E. dejeanii* (HILLER & WITTMANN, 1994; DEC & VIVALLO, 2019), *E. nigrita* Friese, 1900 (GAGLIANONE, 2005; MARTINS et al., 2019), *E. bicolor* Smith, 1854 (ROCHA-FILHO et al., 2008), *E. metatarsalis* Friese, 1899 (THIELE & INOUE, 2007), *E. picta* Smith, 1874 (GAGLIANONE et al., 2015) e *E. albofasciata* Smith, 1874 (ROZEN, 2016). Além disso, outros estudos têm focado no comportamento de fêmeas, como nas pistas visuais e olfativas para o reconhecimento individual da cavidade do ninho em *E. metatarsalis* (INOUE, 2000) e no aprovisionamento de pólen por *E. rustica* Olivier, 1879 (CARVALHO & RAW, 2017). Apesar de avanços no conhecimento sobre o gênero, muitos aspectos ainda são escassos na literatura e são necessários pesquisas direcionadas que elucidem as lacunas existentes.

Epicharis (Anepicharis) dejeanii Lepeletier 1841 é uma das espécies que constroem ninhos em agregações, nidificando principalmente em solos arenosos e é endêmica da América do Sul (HILLER & WITTMANN, 1994; DEC & VIVALLO, 2019). Estudos sobre a biologia de nidificação e comportamento de acasalamento em *E. dejeanii* têm apontado características importantes da ecologia desta espécie. Por exemplo, nesta abelha os machos emergem primeiro que as fêmeas (protandria) e ocorre somente uma geração por ano (espécie univoltina) durante o período mais quente do ano (novembro a fevereiro) (HILLER & WITTMANN, 1994; UEMURA, 2017; DEC & VIVALLO, 2019, 2020; PINA et al., 2020). As fêmeas, durante a construção de ninhos, retiram o solo para o estabelecimento da cavidade, gerando

montículos (*tumulus*), que podem ser facilmente observados, indicando atividade de construção de ninhos (HILLER & WITTMANN, 1994; UEMURA, 2017; DEC & VIVALLO, 2019). As informações sobre o número médio de células produzido pelas fêmeas são controversas, enquanto Uemura (2017) e Dec e Vivallo (2019) apontam para produção de uma ou, no máximo, duas células, Hiller e Wittmann (1994) encontraram um alto número de células reprodutivas, média de 10 células por ninho. Outro fato interessante em *E. dejeanii* é que vários machos voam no agregado e exibem uma intensa competição intraespecífica (PINA et al., 2020; DEC & VIVALLO, 2020), empregando diferentes estratégias de patrulha para o acasalamento: machos maiores patrulham nas plantas e os menores perto do chão, na área de nidificação (PINA et al., 2020). Ainda, os machos podem cavar o solo em busca de fêmeas virgens emergentes (DEC & VIVALLO, 2020).

Embora aspectos importantes da biologia de nidificação e comportamental em *E. dejeanii* já tenham sido elucidados, outras perguntas ainda permanecem sem respostas, como por exemplo: as fêmeas são filopátricas? Elas têm preferência pela construção de ninhos próximos uns aos outros, gerando territórios dentro dos agregados? Existe algum mecanismo de reconhecimento de parentes que evite o colapso da população pela depressão endogâmica?

A construção de ninhos em agregados e a persistência deles na natureza (GAGLIANONE, 2005; THIELE & INOUE, 2007; ROCHA-FILHO et al., 2008; UEMURA, 2017; DEC & VIVALLO, 2019) indicam que as fêmeas de *Epicharis* voltam ao local de nascimento para a construção de seus ninhos. Este provável comportamento filopátrico pode resultar em um elevado grau de parentesco nas populações, pois as agregações tem potencial para aumentar a probabilidade de acasalamento entre parentes (PAXTON et al., 1996; DANFORTH & BALLARD, 2003; LÓPEZ-URIBE et al., 2015). Os acasalamentos endogâmicos aumentam a expressão fenotípica de alelos recessivos deletérios, podendo levar as populações à extinção por depressão endogâmica (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 1987; KELLER & WALLER, 2002). Sendo assim, considerando os altos custos que esta depressão impõe as populações, no caso de *Epicharis*, em que o hábito de nidificar em agregações é relativamente comum (GAGLIANONE, 2005), podem ter surgido estratégias evolutivas que minimizem os acasalamentos endogâmicos, como o reconhecimento entre irmãos.

A patrulha dos machos de *E. dejeanii* em locais específicos nos agregados

(PINA et al., 2020) pode gerar territórios e pode ser indicativo da habilidade dos machos em reconhecer fêmeas aparentadas, principalmente, se as fêmeas construírem seus ninhos em regiões demarcadas nas agregações. Neste sentido, tal comportamento pode indicar a existência de um sistema de reconhecimento pré-acasalamento. Tal sistema poderia impedir acasalamentos entre irmãos nas populações.

As abelhas são particularmente interessantes, por diferentes particularidades, quando estratégias preventivas à endogamia são consideradas. O próprio sistema haplodiploide de determinação do sexo implica em maior parentesco nas famílias de abelhas, as irmãs completas são 75% aparentadas (HAMILTON, 1972; RATNIEKS & HELANTERA, 2009). Deste modo, os efeitos da endogamia podem ser potencializados por um sistema de determinação do sexo que resulte em um elevado grau de parentesco. No entanto, alguns autores sugerem que o sistema haplodiploide minimizaria os efeitos da endogamia nas populações, porque os machos, como haploides, purgariam os alelos deletérios, prevenindo a depressão endogâmica (HENTER, 2003).

Além do sistema haplodiploide de determinação do sexo, muitas espécies de abelhas apresentam um loco sexual, *sl-CSD* (*Single locus complementary sex determination*), que parece ser composto por diferentes alelos, na maioria das populações (COOK, 1993; COOK & CROZIER, 1995; HEIMPEL & BOER, 2008). No entanto, caso esse loco entre em homozigose, ao invés da produção de fêmeas serão produzidos machos diploides estéreis (COOK & CROZIER, 1995). Deste modo, outro resultado dos acasalamentos endogâmicos pode ser a diminuição de alelos no loco *slCSD* e a consequente produção de machos diploides que impõem um custo à população por serem estéreis (METZGER et al., 2010). Assim, a perda da diversidade genética tem sido apontada como uma das prováveis causas responsáveis pelo declínio mundial nas populações de abelhas (WINFREE et al., 2009; ZAYED, 2009; POTTS et al., 2010).

Dentre as técnicas mais utilizadas em estudos genéticos está a da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que consiste em uma sequência de ciclos que permite a multiplicação de fragmentos de DNA a partir de iniciadores (*primers*) e enzimas que realizam a replicação (DNA polimerases), permitindo a análise de amostras do DNA (SNUSTAD & SIMMONS, 2017). Diferentes tipos de marcadores moleculares podem ser obtidos a partir de variações da PCR, por exemplo, AFLP

(*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), entre outros (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados nas últimas décadas estão os microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas (SSRs), que são sequências curtas de DNA que consistem em motivos repetidos em *tandem* de comprimentos variados. Os microssatélites estão mais comumente presentes em regiões não codificantes e são caracterizados por altos níveis de polimorfismo, resultado de dois mecanismos de mutação: deslizamento da enzima durante o processo de replicação e permuta desigual (SNUSTAD & SIMMONS, 2017; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Em virtude dos altos níveis de polimorfismo, esses marcadores multialélicos codominantes têm sido frequentemente usados em estudos para caracterização genética, estrutura populacional e filogeografia nas populações de abelhas sociais (MORITZ et al., 1986; ARIAS et al., 1990; GARNERY et al., 1992; OLDROYD et al., 1992; ARIAS & SHEPPARD, 1996; SMITH et al., 2000). Em abelhas solitárias, que compreendem a maior diversidade de espécies, avanços e aumento no número de investigações analisando a diversidade genética e estrutura populacional, têm ocorrido, principalmente, nas diferentes espécies da tribo Euglossini (SOFIA et al., 2005; CERÂNTOLA et al., 2010; ZIMMERMANN et al., 2011; BOFF et al., 2014; PENHA et al., 2015).

Em abelhas solitárias que nidificam no solo, pesquisas têm demonstrado as dificuldades em encontrar e retirar intactas células de cria nas escavações. Além disso, células que são levadas para os laboratórios e abertas para acompanhar o desenvolvimento dos imaturos, na grande maioria, são atacados por fungos (GAGLIANONE, 2001; MARTINS ET AL., 2014; GAGLIANONE ET AL., 2015; DEC & VIVALLO, 2019). Este hábito de nidificação limitam as inferências genealógicas das populações através dos estudos direto do comportamento. Por conta disso, os marcadores microssatélites tem sido uma importante ferramenta empregada para pesquisas que analisam o parentesco genético entre os indivíduos no agregado, como ocorre em poucos gêneros de abelhas não Neotropicais, como por exemplo, *Amegilla* (BEVERIDGE & SIMMONS, 2006; BEVERIDGE et al., 2006), *Colletes* (DAVIS et al., 2010; LÓPES-URIBE et al., 2015) e *Andrena* (PAXTON et al., 1996; 2000; EXELER et al., 2008; 2010). Já em *Epicharis*, os estudos e ferramentas

moleculares utilizadas, até o momento, se restringiram à uma abordagem evolutiva taxonômica (MARTINS et al., 2015; MARTINS & MELO, 2016).

As análises de marcadores moleculares e químicas se complementam, uma vez que os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são resultantes de herança genética. Estes Hcs, desempenham um papel importante na comunicação química e, conseqüentemente, no reconhecimento entre indivíduos, nos insetos (KELLER & NONACS, 1993; KATHER & MARTIN, 2012). Assim, através destes hidrocarbonetos é possível abordar estudos que foquem no processo de reconhecimento entre irmãos ou parentes próximos como estratégia preventiva à endogamia, que permanece pouco estudado em abelhas solitárias que nidificam em agregações.

Os HCs constituem, geralmente, o grupo estrutural mais abundante da epicutícula dos insetos (KATHER et al., 2011). São sintetizados juntamente com os lipídios pelos enócitos com a função de ajudar a prevenir a dessecação, de aumentar a proteção contra patógenos (GENIN et al., 1986) e atuam, também, na comunicação química (BLOMQUIST et al., 1987, NELSON & BLOMQUIST, 1995; STEINER et al. 2006; FERREIRA-CALIMAN et al., 2010; KATHER & MARTIN, 2015; NUNES et al., 2017). Estes compostos, normalmente, compõem misturas complexas de alcanos, alcenos, alcadienos que variam de forma quantitativa, qualitativa e estrutural (D'ETTORRE & MOORE, 2008), possibilitando aos insetos portarem informações complexas em sua própria cutícula, propiciando um sistema de reconhecimento químico (SMITH, 1983; WCISLO, 1992; LORENZI et al., 1997).

A maioria dos estudos de HCs se concentra nos Hymenoptera, que inclui muitas espécies importantes econômica e ambientalmente, demonstrando que entre suas funções a que se encontra melhor difundida é a de comunicação entre os indivíduos (BLOMQUIST et al., 1987; NELSON & BLOMQUIST, 1995; STEINER et al. 2006; NUNES et al., 2017). Nos insetos solitários, os HCs são utilizados para atrair e identificar parceiros da mesma espécie, discriminação sexual e níveis de parentesco entre os indivíduos (SCHIESTL et al., 1999; PAULMIER et al., 1999; STEINER et al. 2006; BÖRÖCZKY et al., 2009), enquanto que os insetos sociais usam HCs para distinguir indivíduos de diferentes espécies, castas, colônias, *status* de dominância, estágios de desenvolvimento, parentesco, entre outros (WAGNER et al., 2001; MONNIN, 2006; FERREIRA-CALIMAN et al., 2010; KATHER & MARTIN, 2015; NUNES et al., 2017).

As abelhas, em especial, são capazes de fazer distinções olfativas finas

(BREED & STILLER, 1992), um exemplo disso é que elas são capazes de aprender e discriminar entre alcanos que diferem por apenas dois átomos de carbono (GETZ e SMITH, 1987). Isso ocorre porque os HCs são produzidos pelo próprio inseto por meio de características hereditárias, sendo um reflexo do genótipo que é compartilhado por indivíduos pertencentes à mesma espécie (KATHER & MARTIN, 2012). Desta forma, estes semioquímicos, presentes nas cutículas, podem ser pensados como uma extensão fenotípica dos indivíduos (KESSELER, 2006), onde alguns dos hidrocarbonetos constituintes são formados e determinados geneticamente, mas outros são adquiridos a partir do ambiente (KATHER & MARTIN, 2015).

Outra função que vem sendo atribuída aos HCs é que, possivelmente, atuem como feromônios sexuais servindo no reconhecimento entre espécies e entre indivíduos. Pesquisas envolvendo reconhecimento em abelhas sociais foi demonstrado que em *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae) os machos são capazes de reconhecer e rejeitar fêmeas relacionadas geneticamente às que eles acasalaram previamente, assim sugere que eles possam “aprender” os perfis das fêmeas, sendo capazes de distinguir entre fêmeas aparentadas ou não (SMITH, 1983). Em *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) o parentesco genético também se mostrou importante na escolha de parceiros (WHITEHORN et al., 2009). Na tribo Euglossini (Hymenoptera: Apidae), verificou-se que as fêmeas de *Euglossa melanotricha*, no interior dos ninhos, são capazes de identificar quem são aparentadas ou não (ANDRADE-SILVA et al., 2016), e em *E. viridissima* e *E. dilemma* foi verificada a identificação de espécies irmãs, por meio dos hidrocarbonetos (POKORNY et al., 2014). Ainda em Euglossini, os HCs têm apresentado uma variação interespecífica, sendo apontado como uma importante ferramenta taxonômica (BORBA & NASCIMENTO, 2015; POKORNY ET AL., 2015).

Em abelhas solitárias, estes compostos cuticulares desempenham um papel funcional relevante na discriminação química entre os sexos (SCHIESTL et al., 1999; Paulmier et al., 1999; Simmons et al., 2003), bem como atuando no processo de iniciação e inibição da atratividade sexual durante o acasalamento (SCHIESTL & AYASSE, 2000; SIMMONS et al., 2003). Além disso, os poucos estudos realizados também indicam reconhecimento de parentes via compostos cuticulares. Por exemplo, em *Manuelia postica* (Hymenoptera: Apidae) as fêmeas utilizam os HCs para reconhecer suas irmãs de ninho (FLORES-PRADO et al., 2008). Já no caso

particular de *Colletes cunicularius* (Hymenoptera: Colletidae), espécie que possui o hábito de construir os ninhos em agregações, o reconhecimento do local de acasalamento é baseado na atração dos machos pelas fêmeas, indicando que os machos usam os HCs tanto para discriminar quanto para optar por fêmeas de um outro agregado (VERECKEN et al., 2007).

Diante do exposto, conhecer o sistema de acasalamento de uma espécie pode ser fundamental para fornecer valiosas informações sobre os processos evolutivos que moldam o seu comportamento, morfologia e história de vida (PAGE, 1986; BEVERIDGE et al., 2006). Embora relevantes, dados obtidos apenas por meio da observação do comportamento de acasalamento de uma espécie podem ser mascarados pela própria limitação do método, devendo ser usados em conjunto com outros métodos para tornarem mais completos e confiáveis. Neste contexto, o uso de análises genéticas, com base em marcadores microssatélites para estudo de parentesco, associada a uma análise de hidrocarbonetos cuticulares de machos e fêmeas de abelhas podem constituir abordagens valiosas na tentativa de elucidar o papel dos compostos químicos (ex. HCs) e possível interferência na seleção de parceiros no acasalamento. Portanto, um estudo que integre uma análise de parentesco genética, química dos HCs e comportamental se mostra promissor na elucidação de questões em aberto sobre as populações abelhas solitárias em agregações de ninhos.

Objetivo Geral

Investigar aspectos do comportamento, genético e sinalização química de *Epicharis (Anepicharis) dejeanii*, para inferências sobre o sistema de acasalamento, de reconhecimento entre indivíduos, do sexo e do *status* reprodutivo.

Hipóteses

Capítulo 1. O tamanho corporal influencia na estratégia de patrulha dos machos de *E. dejeanii*; e o horário de atividade dos machos é influenciado pela ocorrência de emergência de fêmeas possibilitando maior número de cópulas.

Capítulo 2. A sinalização química em *E. dejeanii*, através dos hidrocarbonetos cuticulares, propicia o reconhecimento de indivíduos aparentados, do sexo e do *status* reprodutivo da fêmea.

Questões Norteadoras

Capítulo 1

- i) Como ocorre o processo de acasalamento de *E. dejeanii* em uma agregação de ninhos?
- ii) Qual o modo como os machos patrulham em busca de fêmeas virgens na agregação de ninhos de *E. dejeanii*?
- iii) O tamanho corporal dos machos influencia com a estratégia de patrulha adotada e com o sucesso de cópula em *E. dejeanii*?
- iv) O horário de emergência das fêmeas coincide com o horário de atividade dos machos, onde ocorre o maior número de cópulas em *E. dejeanii*?
- v) Os machos têm fidelidade com área de patrulha na agregação de ninhos de *E. dejeanii*?

Capítulo 2

- i) Qual a diversidade genética e o nível de endogamia na população da abelha solitária *E. dejeanii*, que vive em agregação de ninhos?
- ii) O perfil dos hidrocarbonetos cuticulares (HCs) de machos e fêmeas atuam na discriminação dos sexos nesta espécie?
- iii) O perfil dos HCs nas fêmeas de *E. dejeanii* sinaliza um novo *status* durante seu ciclo de vida?
- iv) O perfil dos HCs nos machos é diferente, a depender do modo de patrulha empregado no agregado de *E. dejeanii*?
- v) Existe um papel dos HCs no mecanismo de reconhecimento de parentesco na agregação de ninhos da abelha *E. dejeanii*, na Iha do Superagui?

Referências Bibliográficas

- AGUIAR, C.M.L. & GAGLIANONE, M.C. Nesting biology of *Centris (Centris) aenea* (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.20, n.4, p.601-606, dez 2003.
- ALVES-DOS-SANTOS I., MACHADO I.C., GAGLIANONE M.C. História natural das abelhas coletoras de óleo. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.4, p.544-557, nov 2007.
- ANDRADE-SILVA, A.C.R.; MIRANDA, E.A.; DEL LAMA, M.A. & NASCIMENTO, F.S. Reproductive concessions between related and unrelated members promote eusociality in bees. **Scientific Reports**, v.6, n.26635, p.1-9, mai 2016.
- ARIAS, M.C.; SOARES, A.E.E. & NOBREGA, F.G. Improvements to the mitochondrial restriction maps for italian and africanized honey bees. **Revista**

Brasileira de Genética, v.13, n.3, p.501-507, jul 1990.

Arias, M.C. & Sheppard, W.S. 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.5, n.3, p.557-566, jun 1996.

BEVERIDGE, M. & SIMMONS, L. Panmixia: an example from Dawson's burrowing bee (*Amegilla dawsoni*) (Hymenoptera: Anthophorini). **Molecular Ecology**, v.15, n.4, p.951–957, mar 2006.

BEVERIDGE, M.; SIMMONS, L. & ALCOCK, J. Genetic breeding system and investment patterns within nests of Dawson's burrowing bee (*Amegilla dawsoni*) (Hymenoptera: Anthophorini). **Molecular Ecology**, v.15, n.11, p.3459–3467, out 2006.

BLOMQUIST, G.J.; NELSON, D.R. & RENOBABLES, M. Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.6, n.4, p.227–265, mai 1987.

BOFF, S.; SORO, A.; PAXTON, R.J. & ALVES-DOS-SANTOS, I. Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. **Conservation Genetics**, v.15, n.5, p.1123-1135, out 2014.

BÖRÖCZKY, K.; PARK, K.C.; MINARD, R.D.; JONES, T.H.; BAKER, T.C. & TUMLINSON, J. H. Differences in the cuticular lipid composition of the antennae of *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, and *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology**, v.54, n.10/11, p.1385-1391, nov 2008.

BREED, M.D. & STILLER, T.M. Honeybee, *Apis mellifera*, nestmate discrimination: hydrocarbon effects and the evolutionary implications of comb choice. **Animal Behaviour**, v.43, n.6, p.875–883, jun 1992.

BUCKNER, J.S. Polar cuticular lipids. In: STANLEY-SAMEULSON, D.W. & NELSON, D.R. **Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology**. Lincoln: University of Nebraska Press, 1993. p. 227–270.

CARVALHO, F.L. & RAW, A. Specialized diet of the solitary bee *Epicharis rustica* (Apoidea, Centridini): importance of the tree *Byrsonima sericea*. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.61, n.1, p.99–100, jan/mar 2017

CERÂNTOLA, N.C.M; CERVINI, M. & DEL LAMA, M.A. Genetic differentiation of urban populations of *Euglossa cordata* from the state of São Paulo, Brasil. **Apidologie**, v.42, n.2, p.214-222, mar 2011.

CHARLESWORTH, D. & CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p.237-268, nov 1987.

CARDINAL, S.; STRAKA, J. & DANFORTH, B.N. Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.107, n.37, p.16207–11, set 2010.

COOK, J.M. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. **Heredity**, v.71, n.4, p.421-435, set 1993.

COOK, J.M. & CROZIER, R.H. Sex determination and population biology in the Hymenoptera. **Trends in Ecology & Evolution**, v.10, n.7, p.281-286, jul 1995.

COVILLE, R.E.; FRANKIE, G.W. & VINSON, S.B. Nests of *Centris segregata*. (Hymenoptera: Anthophoridae) with a Review of the Nesting Habitats of the Genus. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.56, n.2, p.109-122, Abr 1983.

DANFORTH, B.; J, S. & BALLARD, L. Gene flow and population structure in an oligolectic desert bee, *Macrotera (Macroteropsis) portalis* (Hymenoptera: Andrenidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.76, n.2, p.221-235, abr 2003.

DAVIS, E.S.; MURRAY, T.E.; FITZPATRICK, U.; BROWN, M.J. & PAXTON, R.J. Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floralis*. **Molecular Ecology**, v.19, n.22, p.4922-4935, nov 2010.

DEC, E. & VIVALLO, F. Nesting biology and immature stages of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini). **Apidologie**, v.50, n.5, p.606-615, out 2019.

DEC, E. & VIVALLO, F. Reproductive behavior of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini). **Apidologie**, doi.org/10.1007/s13592-020-00825-7, nov 2020.

D'ETTORRE, P & MOORE, A.J. Chemical communication and the coordination of social interactions in insects. *In*: D'ETTORRE, P. & HUGHES, D.P. **Sociobiology of Communication**. Oxford: Oxford University Press, 2008. p.81–96.

DUNLEY, B.S.; FREITAS, L. & GALETTO, L. Reproduction of *Byrsonima sericea* (Malpighiaceae) in resting fragmented habitats in southeastern Brazil. **Biotropica**, v.41, n.6, p.692-699, nov 2009.

EXELER, N.; KRATOCHWIL, A. & HOCHKIRCH, A. Strong genetic exchange among populations of a specialist bee, *Andrena vaga* (Hymenoptera: Andrenidae). **Conservation Genetics**, v.9, n.5, p.1233-1241, out 2008.

EXELER, N.; KRATOCHWIL, A. & HOCHKIRCH, A. Does recent habitat fragmentation affect the population genetics of a heathland specialist, *Andrena fuscipes* (Hymenoptera: Andrenidae)? **Conservation Genetics**, v.11, n.5, p.1679–1687, mar 2010.

FERREIRA-CALIMAN, M.J.; NASCIMENTO, F.S.; TURATTI, I.C.; MATEUS, S.; LOPES, N.P. & ZUCCHI, R. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. **Journal of Insect Physiology**, v.56, n.7, p.800-804, jul 2010.

FLORES-PRADO, L.; AGUILERA-OLIVEIRA, D. & NIEMEYER, H. M. Nest-mate recognition in *Manuelia postica* (Apidae: Xylocopinae): an eusocial trait is present in a solitary bee. **Proceedings of the Royal Society B**, v.275, n.1632, p.285–291, fev 2008.

FRANKIE, G.; NEWSTROM, L.; VINSON, S. & BARTHELL, J. Nesting-Habitat Preferences of Selected *Centris* Bee Species in Costa Rican Dry Forest. **Biotropica**, v.25, n.3, p. 322-333, set 1993.

GAGLIANONE, M.C. Nidificação e forrageamento de *Centris (Ptilotopus) scopipes* Friese (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n. supl1, p.107-117, jul 2001.

GAGLIANONE, M.C. Nesting biology, seasonality, and flower hosts of *Epicharis nigrita* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Centridini), with a comparative analysis for the genus. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.40, n.3, p.191–200, jun 2005.

GAGLIANONE, M.C.; ROCHA, H.H.S; BENEVIDES, C.R.; JUNQUEIRA, C.N.& AUGUSTO, S.C. Importância de Centridini (Apidae) na polinização de plantas de interesse agrícola: o maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) como estudo de caso na região sudeste do Brasil, **Oecologia Australis**, v.14, n.1, p.152-164, fev 2010.

GAGLIANONE, M.C.; WERNECK, H.A. & CAMPOS, L.A.O. Univoltine life cycle of two species of *Epicharis* Klug, 1807 (Apidae, Centridini) and notes on its cleptoparasites *Tetraonyx* spp. (Coleoptera, Meloidae). In AGUIAR, A.J.C.; GONÇALVES, R.B. & RAMOS, K.S. **Ensaio sobre as Abelhas da Região Neotropical: homenagem aos 80 anos de Danuncia Urban**. Curitiba: Editora UFPR, 2015. pp.401–414.

GARNERY, L.; CORNUET, J.M. & SOLIGNAC, M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. **Molecular Ecology**, v.1, n.3, p.145-154, out 1992.

GENIN, E.; JULLIEN, R. & PEREZ, F. Cuticular hydrocarbons of gregarious and solitary locusts *Lacusta nigrotoria cinerascens*. **Journal of Chemical Ecology**, v.12, n.6, p. 1213-1238, jun 1986.

GETZ, W.M. & SMITH, K.B. Olfactory sensitivity and discrimination of mixtures in the honey bee *Apis mellifera*. **Journal of Comparative Physiology A**, v.160, n.2, p.239-245, mar 1987.

GIANNINI, T.C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G.D.; CARTOLANO, E.A. JR.; VEIGA, A.K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & SARAIVA, A.M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v.46, n.2, p.209–223, mar 2015.

HAMILTON, W.D. Altruism and related phenomena, mainly in social insects. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.3, p.193-232, nov 1972.

HEFETZ, A.; TENGÖ, J.; LÜBKE, G. & FRANCKE, W. Inter-colonial and intra-colonial variation in Dufour's gland secretion in the bumble bee species *Bombus hypnorum* (Hymenoptera: Apidae). In: WIESE, K.; GRIBAKIN, F.G. & RENNINGER,

G. **Advances in life sciences. Sensory system of Arthropods.** Basel: Birkhause Verlag, v.11, 1993. pp.469-480.

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

HENTER, H.J. Inbreeding depression and haplodiploidy: Experimental measures in a parasitoid and comparisons across diploid and haplodiploid insect taxa. **Evolution**, v.57, n.8, p.1793-1803, ago 2003.

HILLER, B. & WITTMANN, D. Seasonality, nesting biology and mating behavior of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii* (Anthophoridae, Centridini). **Biociências**, v.2, n.1, p.107-124, jun 1994.

INOUYE, B.D. Use of visual and olfactory cues for individual nest hole recognition by the solitary bee *Epicharis metatarsalis* (Apidae, Anthophorinae). **Journal of Insect Behavior**, v.13, n.2, p.231-238, fev 2000.

KATHER, R.; DRIJFHOUT, F. P. & MARTIN, S. J. Task Group Differences in Cuticular Lipids in the Honey Bee *Apis mellifera*. **Journal of Chemical Ecology**, v.37, n.2, p.205-212, fev 2011.

KATHER, R. & MARTIN, S. Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. **Physiological Entomology**, v.37, n.1, p.25-32, fev 2012.

KATHER, R. & MARTIN, S.J. Evolution of Cuticular Hydrocarbons in the Hymenoptera: a Meta-Analysis. **Journal of Chemical Ecology**, v.41, n.10, p.871-883, out 2015.

KELLER, L. & NONACS, P. The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal? **Animal Behavior**, v.45, n.4, p.787-794, abr 1993.

KELLER, L.F. & WALLER, D.M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v.17, n.5, p.230-241, mai 2002.

KESSELER, A. Plant-insect interactions in the era of consolidation in biological sciences. *Nicotiana attenuata* as an ecological expression system. In: DICKE, M. & TAKKEN, W. **Chemical ecology: from gene to ecosystem**. Dordrecht: Springer, 2006. pp.19-37.

LOCKEY, K.H. Insect hydrocarbon classes: Implications for chemotaxonomy. **Insect Biochemistry**, v.21, n.1, p.91-97, fev 1991.

LÓPEZ-URIBE, M.M.; MORREALE, S.J.; SANTIAGO, C.K. & DANFORTH, B.N. Nest Suitability, fine-Scale population structure and male-mediated dispersal of a solitary ground nesting bee in an urban landscape. **PLOS ONE**, v.10, n.5, p.e0125719, mai 2015.

LORENZI, M.; BAGNÈRES, A.G.; CLÉMENT, J.L. & TURILLAZII, S. *Polistes biglumis bimaculatus* epicuticular hydrocarbons and nestmate recognition

(Hymenoptera, Vespidae). **Insectes Sociaux**, v.44, n.2, p.123-138, mai 1997.

MACHADO, I.C. Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. *In*: FREITAS, B.M. & PEREIRA, J.O.P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Fortaleza: Imprensa Universitária – Universidade Federal do Ceará, 2004. P.255-280.

MARTINS, A.C. & MELO, G.A.R. The New World oil-collecting bees *Centris* and *Epicharis* (Hymenoptera, Apidae): Molecular phylogeny and biogeographic history. **Zoologica Scripta**, v.45, n.1, p.22–33, jan 2016.

MARTINS, C.F.; PEIXOTO, M.P. & AGUIAR, C.M.L. Plastic nesting behavior of *Centris* (*Centris*) *flavifrons* (Hymenoptera: Apidae: Centridini) in an urban area. **Apidologie**, v.45, n.2, p.156–171, fev 2014.

MARTINS, A.C.; MELO, G.A.R. & RENNER, S.S. Gain and loss of specialization in two oil-bee lineages, *Centris* and *Epicharis* (Apidae). **Evolution**, v.69, n.7, p.1835–1844, jul 2015.

MARTINS, C.F., SANTOS, V.I., & CRUZ, R.D.M. Nesting biology and mating behavior of the solitary bee *Epicharis nigrita* (Apoidea: Centridini). **Journal of Apicultural Research**, v.58, n.4, p.512-521, mar 2019.

METZGER, M.; BERNSTEIN, C.; HOFFMEISTER, T.S. & DESOUHANT, E. Does kin recognition and sib-mating avoidance limit the risk of genetic incompatibility in a parasitic wasp? **PLoS One**, v.5, n.10, p.e13505, out 2010.

MICHENER, C.D. **The bees of the world**. Baltimore: The John Hopkins University Press, 2007.

MONNIN T. Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Annales Zoologiques Fennici*, v.43, n.5, p.515–530, dez 2006.

MORITZ, R.F.A.; HAWKINS, C.F.; CROZIER, R.H. & MACKINLEY, A.G. A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.). **Experientia**, v.42, n.3, p.322-324, mar 1986.

MOURE, J.S.; MELO, G.A.R. & VIVALLO, F. 2012. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region: Centridini Cockerel & Cockerell, 1901**. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 01 dez 2020.

NEFF, J. & SIMPSON, B.B. Oil-collecting structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): morphology, function and use in systematics. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.54, n.1, p.95-123, jan 1981.

NEFF, J.L. & SIMPSON, B.B. Vogel's great legacy: The oil flower and oil-collecting bee syndrome. **Flora**, v.232, p.104–116, jun 2017.

NELSON, D.R. & BLOMQUIST, G.J. Insect waxes. *In*: HAMILTON, R.J. **Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions**. Dundee: Oily Press, 1995. p.1-90.

NUNES, T.; OLDROYD, B.; ELIAS, L. MATEUS, S.; TURATTI, I.C. & LOPES, N.P. Evolution of queen cuticular hydrocarbons and worker reproduction in stingless bees. **Nature Ecology & Evolution**. v.1, n.185, p.1-3, jun 2017.

OLDROYD, B.P.; SHEPPARD, W.S. & STELZER, J.A. Genetic characterization of the bees of Kangaroo Island, South Australia. **Journal of Apicultural Research**, v.31, n.3/4, p.141-148, dez 1992.

PAULMIER, I.; BAGNÈRES, A. G.; AFONSO, C. M. M.; DUSTICIER, G.; RIVIÈRE, G. & CLÉMENT, J. L. Alkenes as a sexual pheromone in the alfalfa leaf-cutter bee *Megachile rotundata*. **Journal of Chemical Ecology**, v.25, n.3, p.471-490, mar 1999.

PAXTON, R.; THORÉN, P.; TENGO, J.; ESTOUP, A. & PAMILO, P. Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites. **Molecular Ecology**, v.5, n.4, p.511–519, ago 1996.

PAXTON, R.J.; THORÉN, P.A.; GYLLENSTRAND, N.; & TENGÖ, J. Microsatellite DNA analysis reveals low diploid male production in a communal bee with inbreeding. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.69, n.4, p.483-502, abr 2000.

PENHA, R.E.S.; GAGLIANONE, M.C.; ALMEIDA, F.S.; BOFF, S.V. & SOFIA, S.H. Mitochondrial DNA of *Euglossa iopoecila* (Apidae, Euglossini) reveals two distinct lineages for this orchid bee species endemic to the Atlantic Forest. **Apidologie**, v.46, n.3, p.346–358, mai 2015.

PINA, W.C.; SOUZA-SHIBATTA, L.; UEMURA, N.; GOBATTO, A.L.; FREIRIA, G.A. & SOFIA, S.H. Male strategies and mating behavior in the Neotropical bee *Epicharis (Anepicharis) dejeanii* (Apidae: Centridini). **Journal of Apicultural Research**. doi: 10.1080/00218839.2020.1733197, mar 2020.

POKORNY, T.; LUNAU, K.; QUEZADA-EUAN, J.J.G. & ELTZ, T. Cuticular hydrocarbons distinguish cryptic sibling species in *Euglossa* orchid bees. **Apidologie**, v.45, n.2, p.276-283, fev 2014.

POKORNY, T.; RAMÍREZ, S.R.; WEBER, M.G. & ELTZ, T. Cuticular Hydrocarbons as Potential Close Range Recognition Cues in Orchid Bees. **Journal of Chemical Ecology**, v.41, n.12, p.1080-1094, dez 2015.

POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O & KUNIN, W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v.25, n.6, p.345-353, jun 2010.

RATINIEKS, F.L.W. & HELANTERA, H. The evolution of extreme altruism and inequality in insect societies. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.364, n.1533, p.3169-3179, nov 2009.

ROCHA-FILHO, L.C.; SILVA, C.I.; GAGLIANONE, M.C. & AUGUSTO, S.C. Nesting behavior and natural enemies of *Epicharis (Epicharis) bicolor* Smith 1854 (Hymenoptera Apidae). **Tropical Zoology**, v.21, n.2, p.227–242, abr 2008.

ROIG-ALSINA, A. & MICHENER, C.D. Studies of the phylogeny and classification of longtongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin**, v.55, n.4/5, p.123-173, mai 1993.

ROUBIK, D.W. & MICHENER, C.D. The seasonal cycle and nests of *Epicharis zonata*, a bee whose cells are below the wet season water table (Hymenoptera, Anthophoridae). **Biotropica**, v.12, n.1, p.56-60, mar 1980.

ROZEN, J.G.JR. Nesting biology of the solitary bee *Epicharis albofasciata* (Apoidea: Apidae: Centridini). **American Museum Novitates**, v.3869, n.3869. p.1–8, dez 2016.

SANTOS, A.B. & NASCIMENTO, F.S. Cuticular hydrocarbons of orchid bees males: interspecific and chemotaxonomy variation. **PLoS One**, v.10, n.12, p.e0145070, dez 2015

SAZAN, M.S., BEZERRA, A.D.M., & FREITAS, B.M. Oil collecting bees and *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (Malpighiaceae) interactions: The prevalence of long-distance cross pollination driving reproductive success. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, n.1, p.347-357, fev 2014.

SCHIESTL, F.P. & AYASSE, M. Post-mating odor in females of the solitary bee, *Andrena nigroaenea* (Apoidea, Andrenidae), inhibits male mating behavior. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.48, n.4, p.303-307, ago 2000.

SCHIESTL, F.P.; AYASSE, M.; PAULUS, H.F.; LÖFSTEDT, C.; HANSSON, B. S.; IBARRA, F. & FRANCKE, W. Orchid pollination by sexual swindle. **Nature**, v.399, n.6735, p.421-422, jun 1999.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas Brasileiras: sistemática e identificação**. 1ª ed. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002.

SIMMONS, L.; ALCOCK, J. & REEDER, A. The role of cuticular hydrocarbons in male attraction and repulsion by female dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni*. **Animal Behaviour**, v.66, n.4, p.677-685, set 2003.

SMITH, B.H. Recognition of female kin by male bees through olfactory signals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.80, n.14, p.4551-4553, jul 1983.

SMITH, D. R.; VILLAFUERTE, L.; OTIS, G. & PALMER, R. Biogeography of *Apis cerana* F. and *A. nigrocincta* Smith: insights from mtDNA studies. **Apidologie**, v.31, n.2, p.265-279, mar/abr 2000.

SNUSTAD, D.P. & SIMMONS, M.J. **Fundamentos de Genética**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2017.

SOFIA, S.H.; PAULA, F.M.; SANTOS, A.M.; ALMEIDA, F.S. & SODRÉ, L.M.K. Genetic structure analyses of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae) populations from southern Brazilian Atlantic rainforest remnants. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.3, p.479-484, ago 2005.

STEINER, S.; HERMANN, N. & RUTHER, J. Characterization of a female produced

courtship pheromone in the parasitoid *Nasonia vitripennis*. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, n.8, p.1687–1702, ago 2006.

THIELE, R. & INOUE, B.D. Nesting biology, seasonality, and mating behavior of *Epicharis metatarsalis* (Hymenoptera: Apidae) in Northeastern Costa Rica. **Annals of the Entomological Society of America**, v.100, n.4, p.596–602, jun 2007.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C.M. & PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.

UEMURA, N. **Estrutura do ninho e atividades de nidificação de Epicharis (Anepicharis) dejeanii (Apidae, Centridini) na Ilha do Superagui, sul do Brasil**. (Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas), Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2017.

VERECKEN, N.J.; MANT, J. & SCHIESTL, F.P. Population differentiation in female sex pheromone and male preferences in a solitary bee. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.61, n.5, p.811-821, mar 2007.

VILHENA, A. M. G. F., RABELO, L.S., BASTOS, E. M. A. F., & AUGUSTO, S.C. Acerola pollinators in the savanna of Central Brazil: Temporal variations in oil-collecting bee richness and a mutualistic network. **Apidologie**, v.43, n.1, p.51–62, jan 2012.

VINSON, S.; FRANKIE, G. & WILLIAMS, H. Chemical ecology of bees of the genus *Centris* (Hymenoptera: Apidae). Behavioral Ecology Symposium'95. **Florida Entomologist**, v.79, n.2, p.109-129, jun 1996.

VOGEL, S. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. **Tropische und Subtropische Pflanzenwelt**, v.7, p.285-547, set 1974.

WAGNER, D.; TISSOT, M. & GORDON, D. Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *Journal of Chemical Ecology*, v.27, n.9, p.1805–1819, set 2001.

WCISLO, W.T. Attraction and learning in mate-finding by solitary bees, *Lasioglossum (Dialictus) figueresi* Wcislo and *Nomia triangulifera* Vachal (Hymenoptera, Halictidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.31, n.2, p.139–148, ago 1992.

WHITEHORN, P.R.; TINSLEY, M.C. & GOULSON, D. Kin recognition and inbreeding reluctance in bumblebees. **Apidologie**, v.40, n.6, p.627–633, nov/dez 2009.

WINFREE, R.; AGUILAR, R.; VAZQUEZ, D.P.; LEBUHN, G. & AIZEN, M.A. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. **Ecology**, v.90, n.8, p.2068–2076, ago 2009.

ZAYED, A. Bee genetics and conservation. **Apidologie**, v.40, n.3, p.237–262, mai 2009.

ZIMMERMANN, Y.; SCHORKOPF, D. L. P.; MORITZ, R. F. A.; PEMBERTON, R. W.;

QUEZADAEUAN, J. J. G. & ELTZ, T. Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. **Conservation Genetics**, v.12, n.5, p.1183-1194, out 2011.


CAPÍTULO 1

**Male strategies and mating behavior in the Neotropical bee *Epicharis*
(*Anepicharis*) *dejeanii* (Apidae: Centridini)**

Esse capítulo foi publicado no periódico Journal of Apicultural Research, Mar 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1733197>

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Male strategies and mating behavior in the Neotropical bee *Epicharis (Anepicharis) dejeanii* (Apidae: Centridini)

Welber Costa Pina^{a,b,c}, Lenice Souza-Shibatta^b , Natalia Uemura^{a,b}, André Luiz Gobatto^{a,b}, Gabriele Antico Freiria^b  and Sílvia Helena Sofia^{a,b,*} 

^aPrograma Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil; ^bDepartamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil; ^cDepartamento de Educação, Universidade do Estado da Bahia, Teixeira de Freitas, BA, Brazil

(Received 13 September 2019; accepted 18 February 2020)

This study describes the mating behavior of *Epicharis dejeanii* and evaluates the reproductive strategies employed by males during the reproductive period. Samples were collected in an aggregation of *E. dejeanii* nests, located in southern Brazil. Observations on mating behavior and male patrols were performed for 37 days, from 06:00 to 18:00, during two reproductive periods, in the wet-warm season. During the samplings, males patrolling and/or copulating with *E. dejeanii* females were collected and used for morphometric measurements. Males were active in November and December when they showed two mating patrol strategies: i) flyover near the ground; (ii) flights over trees (at heights of approximately 2.5 m and distant about 2 to 5 m from nesting aggregation). The results revealed a greater head width and intertegular distance among males patrolling above the plants, suggesting that the adopted patrol strategy has an association with the body size of males. However, both strategies were effective in copulation success. The males demonstrated a peak of activity in the patrol for females between 9:00 and 11:30 hours, which coincided with the period of greatest emergence of females, as well as when the largest number of matings were observed.

Keywords: male patrolling; body size; Neotropical bee; reproductive tactics; nest aggregation

Introduction

The selection of a mating partner by the female is widely diversified in the animal kingdom (Andersson, 1994; Thornhill & Alcock, 1983). According to Roitberg and Isman (1992), if one sex invests significantly more in the offspring, this sex will necessarily try to maximize its reproductive fitness by choosing the best possible partner. Thus, as females typically invest in offspring more heavily than males, they evaluate the qualities of the male before accepting it for mating (Alcock, Eickwort, & Eickwort, 1977; Paxton, 2005).

Studies on mating systems have revealed considerable intraspecific variability in mechanisms to ensure copulation (Andersson, 1994; Thornhill & Alcock, 1983). In many cases, males show several morphological characteristics, life histories, or behaviors that ensure their success in mating (Gross, 1996).

Solitary male bees do not seek out their partners randomly; instead, they exhibit diverse reproductive behavioral strategies (Eickwort & Ginsberg, 1980), such as: males can seek out and wrestle with other males for females in nesting areas (Alcock, Eickwort, et al., 1977; Eickwort & Ginsberg, 1980; Hiller & Wittmann, 1994); carry out patrols waiting for virgin females in an

emergence area, such as in nest aggregations (Alcock, 2013) or wait for them in flowers (Oliveira & Schindwein, 2010); they can also defend territory or other attractive resources (Alcock, Eickwort, et al., 1977; Medeiros & Schindwein, 2003) or attract females to sites without resources through pheromones (Roubik, 1989). In the case of territorial males, these may defend a particular group of plants (Alcock 2013). Another behavior exhibited by males in areas where virgin females are emerging is to dig and enter nests in search of females even before they come to the surface (Alcock, Jones, & Buchmann, 1977; Alcock, Jones, & Buchmann, 2009).

Where large nest aggregations are settled, adult males are commonly seen patrolling the area, exhibiting a behavior described by Alcock (2013) as follows: “large numbers of males gather in these places to cruise close to the ground from early morning to late afternoon, with the bees flying low and sinuous routes in a particular part of the emergence area.”

Intraspecific male dimorphism, such as differences in male body size, is presumably another reproductive strategy which could be associated (Alcock, 2013) or not (Paxton, 2005) with male territoriality. According to Alcock (2013), larger males seen around the nest

*Corresponding author: Email: shsofia@uel.br; shsofiabelh@gmail.com

*WCP, NU and ALG carried out the field activities. SHS, WCP and GAF participated in the study sample design. SHS, WCP, GAF and LSS carried out the interpretation of the final data. All authors participated in the writing of the final document.

entrance, defending virgin females' emergence sites against smaller males usually experience higher success compared to their smaller rivals. Concerning smaller males, some studies also show that they are usually less aggressive, patrolling in plants or even around the edge of nest aggregations (Alcock, Eickwort, et al., 1977; Danforth, 1991; Oliveira & Schlindwein, 2010; Paxton, 2005).

Considering that, in solitary bee species, females almost certainly mate only once, males successful in mating with virgin females as soon as these females emerge, and before their rivals, will probably present an advantage in nature (Alcock, 2013).

Although a number of studies on the mating behavior of bees have been published over the last five decades, the current knowledge about this theme is limited to a restricted number of species (for review see Alcock, 2013; Paxton, 2005). Furthermore, among the bee species worldwide for which sexual behavior has already been studied and information is available, only a few belong to Neotropical fauna (Frankie, Vinson, & Coville, 1980; Martins, Santos, & Cruz, 2019; Rocha-Filho, Silva, Gaglianone, & Augusto, 2008; Thiele & Inouye, 2007). Thus, despite the high diversity in bee species inhabiting the neotropics (Silveira, Melo, & Almeida, 2002), to date, we know almost nothing about the mating behavior of these species.

Among the Neotropical bee species for which mating behavior has been studied in recent decades, some belong to the *Epicharis* Klug, 1807 genus (Hiller & Wittmann, 1994; Martins et al., 2019; Rocha-Filho et al., 2008; Thiele & Inouye, 2007), which is endemic to the neotropics. The genus includes hairy bees, with sizes ranging from medium to large, which have large flight capacity (Moure, Melo, & Vivallo, 2012; Silveira et al., 2002). Their nesting habit involves digging holes in the ground to build nests (Gaglianone, 2005; Martins et al., 2019) and some species can form large aggregations (Hiller & Wittmann, 1994; Inouye, 2000; Martins et al., 2019; Roubik & Michener, 1980).

Aspects related to seasonality, nesting biology, natural enemies, and potential floral resources have been described for some species of *Epicharis*, such as in *E. dejeanii* (Hiller & Wittmann, 1994), *E. bicolor* Smith 1854 (Rocha-Filho et al., 2008), *E. metatarsalis* Friese 1899 (Thiele & Inouye, 2007), and *E. albofasciata* Smith 1874 (Rozen, 2016). In addition, other studies have focused on the behavior of females, such as the visual and olfactory cues for individual recognition of the nest cavity in *E. metatarsalis* (Inouye, 2000) and the supply of pollen in *E. rustica* Olivier, 1879 (Carvalho & Raw, 2017). With regard to mating behavior of *Epicharis* species, information available in the literature is limited to a small number of species (e.g., Gaglianone, 2005; Hiller & Wittmann, 1994; Rocha-Filho et al., 2008; Thiele & Inouye, 2007), and not rarely the reports are incomplete. More recently, Martins et al. (2019) described in detail the mating behavior of *Epicharis nigrata* Friese 1900.

Epicharis (Anepicharis) dejeanii Lepeletier 1841, the focal species of our study, shows a wide distribution

across the Brazilian territory, and a record of occurrence also in French Guiana (Moure et al., 2012). It is a seasonal and univoltine species, which shows activity during the warm wet-season (from October to March), with its males emerging before females (protandry). The females build their nests on the ground, one next to the other, forming aggregations (Hiller & Wittmann, 1994; Uemura, 2017).

Thus, considering the scarce and incomplete reports on mating behavior of Neotropical bees and the relevance of the knowledge on the reproductive strategies of the different species for a better understanding of the natural history of the species (Thornhill & Alcock, 1983), the objective of this work was to describe the mating behavior of *E. dejeanii* and to investigate the reproductive strategies employed by males during the mating period in an area containing an aggregation of nests of this species.

Materials and methods

Characterization of the study area

The study was carried out on Superagui Island (SI) (25°15'S-25°29'S, 48°06'W-48°19'W), an artificial island, with an extension of 11,000 ha, located in the municipality of Guaraqueçaba, north coast of the state of Paraná, southern Brazil. The island is part of the Superagui National Park (SNP), which has a total area of 33,988.00 ha, being one of the Conservation Units of the Environmental Protection Area (APA) of Guaraqueçaba (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade [ICMBIO], 2016).

According to the Köppen-Geiger classification, the climate of the island is characterized as humid subtropical, mesothermic. The summers are hot, with an average temperature above 22 °C in the hottest month; and in the coldest month, the temperature can reach 3 °C. The humidity is always high and the rains are well distributed throughout the year, the average annual rainfall is 2,364.8 mm (Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social [IPARDES], 2001). The region contains a combination of Dense Ombrophilous Forest and pioneer formations, among them the Restinga area, which comprises 30% of the total and is gradually replaced by the forest, as the vegetation moves away from the sea (Schmidlin, Accioly, & Kirchner, 2005).

The aggregation

The aggregation of *E. dejeanii* nests is located in a Restinga area on Superagui Island (25°27'51.4"S, 48°14'07.1"W) at sea level and occupying an area of approximately 2,000 m². The area where the nests are found consists of one flat and one sloping region and the average density of nests in the aggregation is approximately one nest/m².

The aggregation has been monitored by Laboratory of Animal Genetics and Ecology (LAGEA) during the last five years. During this period of follow up, it was

possible to identify that this is a univoltine species, with a period of emergence and nesting activity that begins at the end of October and runs until early February (Uemura, 2017).

Behavioral analyses

The bees were observed during November and December 2017 and November and December 2018, the reproductive period of the species in the region (Uemura, 2017), totaling 37 days and 444 h of field samplings. The surveys were distributed into four periods of field observations, as follows: 1st period: from 01 to 13 November 2017; 2nd: 04-10 December 2017; 3rd: 06 15 November 2018, and 4th period: from 04 to 10 December 2018.

All samplings were conducted from 6:00 to 18:00 h, a period of great activity of both males and females of *E. dejeanii* in the studied area (Uemura, 2017), as well as in another locality also in southern Brazil (Hiller & Wittmann, 1994).

During the observation periods, five circular-shaped areas, each measuring approximately 50 m², were delimited with string, metal tapes, and wooden stakes. The purpose was to establish fixed points within the aggregation to observe the behavior of *E. dejeanii* males. The behavior analyzes included a record of behaviors displayed by males (and sometimes females), including copulation (mating) observations, in this case with the aid of a digital camera. The videos were later analyzed for more detailed analysis of the behaviors observed in the field.

To evaluate the total abundance of males at each hour of the day, a collector sampled, using an entomological net, males across the nest aggregation area for 20 minutes every hour, in a total of 10 non-consecutive days.

During the surveys, males were captured with an insect net, anesthetized on ice, marked on their thorax (mesoscutum) with tags, and painted (model: Posca Uniball Mitsubishi) with five different colors, and, immediately after, released. This methodology was used to record the activities of marked individuals around the nest aggregation (Rutowski & Alcock, 1980). In order to evaluate the existence or not of male loyalty to specific areas of the aggregation, twenty ($n=20$) males marked for ten days were followed through the recapture technique. In addition, daily inspections of the surrounding plants were carried out at dawn and at dusk, in order to locate possible locations of male dormitories.

Additionally, aiming to capture the emerging virgin young males and females, 20 soil emergence traps (covered by a mesh fabric), measuring 1.5 m x 1 m x 0.5 m, were distributed randomly across the nesting aggregation area. This procedure was also used to gain information on the times of bee emergence during the day and to evaluate the possible association between emergence time of females and the male patrolling period.

Morphological analyses

Individual males showing different patrolling tactics or mating with females were captured with an insect net, killed on ice, and taken to the laboratory, where linear morphometric analyses of these individuals were carried out. Three measurements were taken from each bee: head width (the greatest distance between the compound eyes), intertegular span, and right forewing length (Cane, 1987). All measurements were carried out in a photostereomicroscope Zeiss (Model: Stereo Discovery.V20).

In the case of males collected during copulation behavior, these were captured to infer, through the medians of the morphometric measurements, the existence of a possible relation between male size and mating success. In the comparisons between the groups, the Mann-Whitney test, implemented in the RStudio program (RStudio Team, 2015), was used. Values were considered significant at $p < 0.05$.

Voucher specimens of bees were deposited in the Bee Collection of LAGEA (Laboratório de Genética e Ecologia Animal, Departamento de Biologia Geral) and vouchers of different plant species where males were seen showing patrolling behavior were deposited at the Herbarium (Departamento de Biologia Animal e Vegetal) of the State University of Londrina.

Results

Male patrolling behavior

The males were observed in the aggregation in the months of November and December, in the two reproductive seasons analyzed. In the months of October and January, although some females were active, no males were observed in the aggregation, therefore, the observations of these months were not considered in this study. Two patrolling strategies were observed in the *E. dejeanii* males in search of females, in plants and near the ground. When patrolling plants, males flew at a height of 2.50 m, and were found in the following species: *Ocotea pulchella* (Nees) Mez, *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn, *Psidium cattleianum* Sabine, and *Ternstroemia brasiliensis* Cambess. Near the ground, the males patrolled at heights between 10 and 20 cm from the ground. An interesting observation is that the males found patrolling on the ground, were also found in plants, however, these plants were less than one meter high. Another important information is that males patrolling plants were usually ($n = 32$ from 37 observations) the first to arrive and last to leave the aggregation area.

Regarding the flight characteristics during the patrols, they were similar both in the plants and near the ground and dependent on the area covered by the males. Males patrol a large area on circular flights and when they demarcate a smaller area they fly zigzag or in figure eight ($n = 50$). In addition, in the case of circular flights, the males did not make more than five turns in

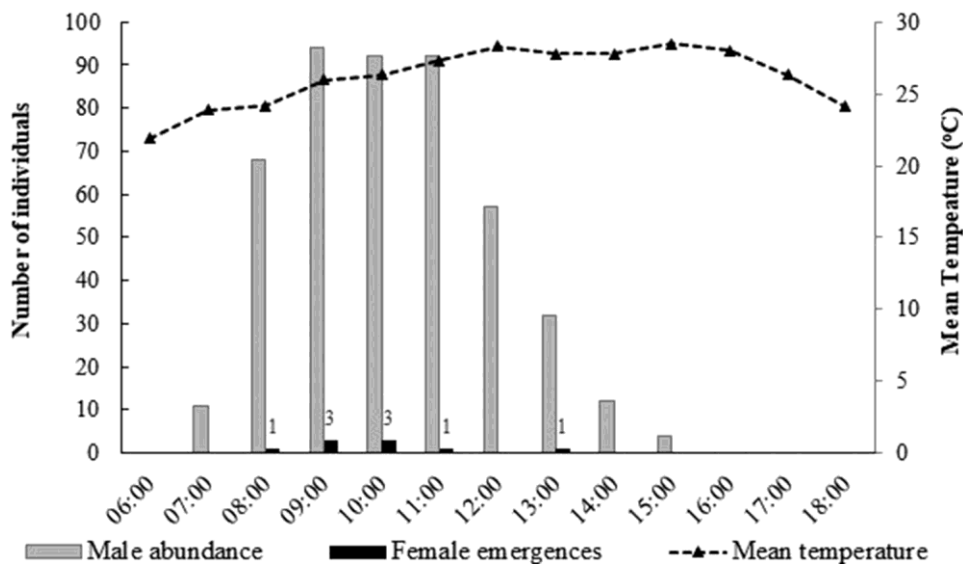


Figure 1. Measures of mean temperature ($^{\circ}\text{C}$), total number (abundance) of *Epicharis dejeanii* males collected, and number of emerging females (sampled at different times of the day, during ten non-consecutive sampling days, at Superagui Island, Guaraquecaba, Paraná, southern Brazil. Number above the bar indicates number of females emerged.

the same direction: they alternated these flights clockwise and counterclockwise. The same was observed for flights in figure eights; the direction traveled was often alternated.

On sunny days, patrols occurred between 7:00 and 15:00, with peak activity between 9:00 and 11:30 (Figure 1). The earliest record of male patrolling was at 7:03, while 15:47 was the latest recorded patrol in the area.

Out of twenty males observed, most of them ($n = 14$) were loyal to patrol areas in the aggregation, only six moved to patrol different areas in the aggregation, however, these were also loyal to the new areas. In addition, only three males changed their patrol location for females, from the top of the trees to the ground. Thus, male loyalty was observed for both the patrol sites and restricted areas in the aggregation.

Despite the existence of males patrolling in plants, females were not seen visiting the plants where the males were. No observations were recorded of males perching on the plants they patrolled, or any aggregation of males sleeping in the patrolled plants or neighboring areas. The only observation made was that one of the males landed on the patrolled plant for approximately 3 seconds.

Regarding flights near the ground, although nesting was carried out in very close proximity, no males were observed digging for females that had not yet emerged. However, several males were seen entering nests ($n = 50$); circling very close to the entrance of the nests, before entering them. They remained within the nest for on average $7.6 \text{ s} \pm 11.3$. On four occasions, two males entered and exited the same nest concurrently.

Emergences

In total, 14 individuals emerged from the soil traps, nine females and five males. Except for one female and one

male who emerged in the afternoon, all other emergences (86%) of adults occurred in the morning (Figure 1). Besides, the greatest abundance of males flying over the aggregation occurred at times of the emergence of the majority of females.

Morphometric analyses

Regarding the size of the males and the patrol strategy adopted, of the 36 individuals analyzed (each group consisted of 18 males), the wing lengths did not present significant differences ($W = 197$, $p\text{-value} = 0.2749$). However, head width ($W = 241$, $p\text{-value} = 0.01294$) and intertegular distance ($W = 243$, $p\text{-value} = 0.01082$) was larger among males patrolling above the plants, indicated that the patrol strategy adopted at each site is associated with the body size of the males. Larger males patrolled the plants and the smaller ones near the ground (Figure 2A, B).

Regarding the morphometric analyses performed with the males captured at the time of mating, in six matings, eight males were measured, that is, on two occasions, two males competed until the end to be able to mate with the female. The median intertegular distance of the plant patrol individuals was 5.77 mm and head width 5.71 mm, while the medians for the ground patrolling males were 5.54 mm and 5.55 mm, respectively. In this way, the males involved in matings were classified into four large males (plant patrol) and four small males (ground patrollers). On both occasions where there were disputes to mate with the female, the males involved were the same size.

Mating behavior

All observed copulations ($n = 9$) occurred during the morning and seven occurred at the times when there

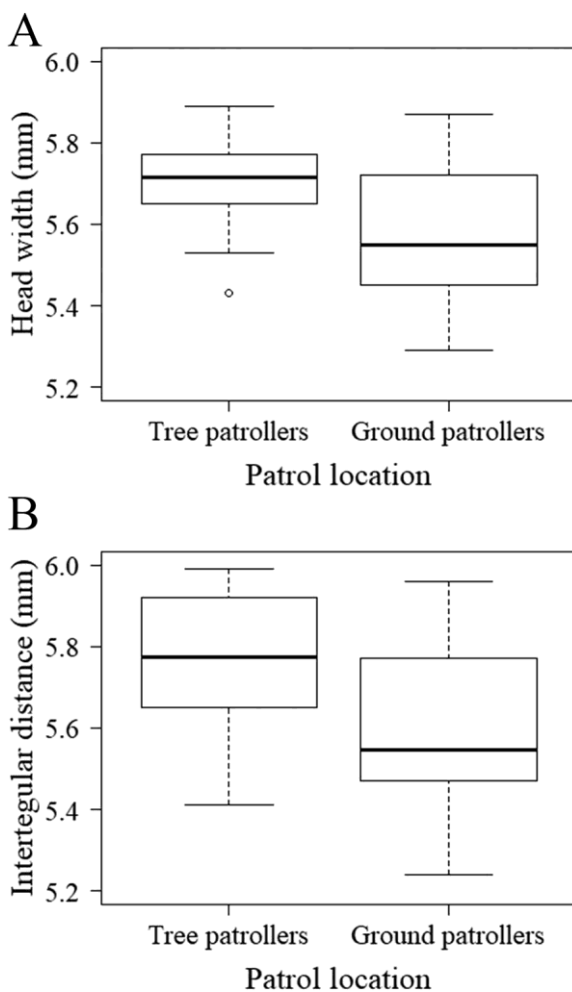


Figure 2. Mean morphometric measures (mm), (A) head width and (B) intertegral distance, obtained for the two groups of *Epicharis dejeanii* males analyzed: tree and ground patrollers. The bars represent the standard deviation for each group analyzed. Each group consisted of 18 males.

were more males in the aggregation. The mating behavior involves more than one male surrounding the same female, however, in the observations made only one of the males copulated with the female, with an average mating duration of 88 s (± 14.35 s; $n = 9$).

The mating began with the males touching the females with their forelegs during the flight, if the female was receptive, the male grasped/intercepted them during flight and the two ended up falling on the ground or on the plant. The males then used their fore and middle legs to immobilize the female. With their hind legs, the males tried to immobilize the hind legs of the female and curved their abdomen to stimulate genital contact. After this contact, the vibration of the thorax produced a continuous humming, and, concomitantly, the males and females touched their antennas repeatedly. During copulation, the males often rubbed their hind legs on the abdomen and hind legs of the female; in addition, the female was always looking for a substrate, such as tree branches, to hold with her mandibles (Figure 3A–F).

After copulation, the male flies away, followed soon after by the female also flying away. While males returned to the same area to patrol and look for new copulations, females received new advances from males, but they raised their hind legs (rejection behavior), pre-venting new copulation ($n = 10$). During $\frac{1}{4}$ the search for a nest site (116 observations) and supplying of cells (151 observations) by the females, no new copulations were observed, although the males were flying over the area and attempted copulation.

Discussion

Male patrol behavior

Although the females had a broad activity schedule throughout the day, the males presented a much lower activity schedule, coinciding with the females' emergence period. The overlap in the period of greater activity of males with the period of emergence of females has already been verified in other solitary species, such as in *Centris adani* Cockerell 1949 (Frankie et al., 1980) and *Centris burgdorfi* Friese 1900 (Sabino, Silva, & Alves-dos-Santos, 2017). These observations corroborate with the hypothesis of Alcock (2013), who suggests that males look for females in periods where mating probability is higher, minimizing the loss of energy.

Distinctively of our observations, Hiller and Wittmann (1994) reported males of *E. dejeanii* patrolling the nesting site and in the vicinity of the nests at the flight corridor between nests and plants. The patrol behavior of males is a relatively usual behavior in *Epicharis* (Gaglianone, 2005; Moure, 1945; Raw, 1992; Rocha-Filho et al., 2008; Thiele & Inouye, 2007). Thiele and Inouye (2007) suggested that there are at least three mating strategies shown by males of the genus *Epicharis*: i) patrolling at the nesting site, ii) patrolling flowers (food resources), and iii) digging for females. In the present study, males of *E. dejeanii* were also observed patrolling on non-flowering plants very close to nest aggregation. This behavior suggests that the patrolling at the nesting sites could be of two types: i) flyover near the ground and ii) flying farther from the ground, over non-flowering plants near the nesting site.

The same behavior of alternated periods of flying in circles or figure eights during patrolling, herein described for *E. dejeanii* males, was also reported by Thiele and Inouye (2007) for *E. metatarsalis*, revealing similar patterns of behavior between these species of *Epicharis*. According to Alcock (1979), the occurrence of different male mating tactics within a species reflects the ability of individuals to adopt alternative behaviors, depending on environmental conditions and behaviors that are exhibited.

The ability of males to find pre-emergent females has been recorded in some solitary bees, such as *Centris pallida* (Alcock et al., 2009), *C. burgdorfi* (Sabino et al., 2017), a

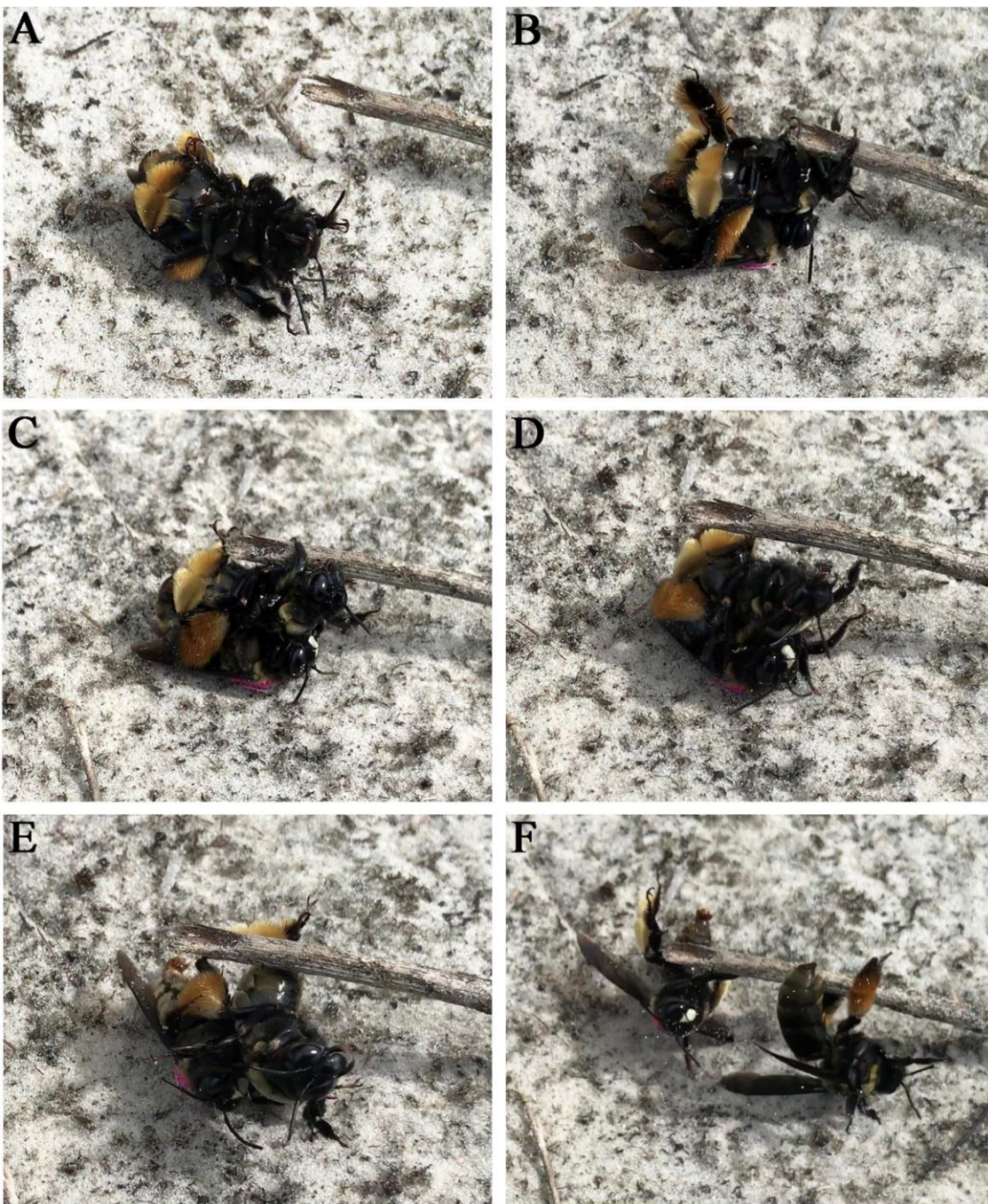


Figure 3. A sequence of mating of *Epicharis dejeanii* (A-F) in a Restinga area at the Superagui Island. (A) the male tries to immobilize the female, over him, using his legs; (B) the female is looking for a substrate (twig) to grab with her legs; (C) the female grabs the substrate with her legs and mandibles; (D) the female releases the twig; (E) and (F) end of the mating, with male and female releasing from each other.

Colletes cunicularius Linnaeus 1761 (Bergström & Tengö, 1978). In these species, it is common for males to dig in the soil in the peak emergence period of the females to search for them; this behavior enables a certain male to succeed in copulation before other competitors appear (Alcock, 2013). However, this behavior was not recorded in the present study, and thus, this mating strategy does not seem to occur in the *E. dejeanii* species.

Males of certain species of solitary bees patrol in flowers where females collect resources and/or feed

(Alcock, Bailey, & Simmons, 2010; Alcock & Buchmann, 2011). This behavior has been described for different species of Centridini including *Centris burgdorfi* (Sabino et al., 2017), *Centris scopipes* Friese 1899 (Gaglianone, 2001), *Centris heithausi* Snelling 1974 (Coville, Frankie, Buchmann, Vinson, & Williams, 1986). However, at least in the area adjacent to the nests, where females were seen collecting in some plant species, the *E. dejeanii* males were not observed on any of these occasions in the plant species visited by the females; besides which,

it is worth mentioning that all the plants patrolled by them were not flowering.

Interestingly, *E. dejeanii* males exhibited opposite behavior relative to patrol and body size compared to other species of solitary bees. In *Anthidium maculosum* (Alcock, Eickwort, et al., 1977), *Centris pallida* (Alcock, Jones et al., 1977), *Perdita portalis* Timberlake 1954 (Danforth, 1991), and *Amegilla dawsoni* Rayment 1951 (Alcock, 1997), it was verified that the larger males patrol near the ground, while the smaller males patrol the periphery and/or flowering plants present in the aggregation area. This strategy could help to avoid clashes between males (Alcock, Eickwort et al., 1977). While the advantage of patrolling far from the ground is not clear, this outcome shows that differences in patrol strategies may occur between different species.

According to Alcock, Eickwort et al. (1977), the existence of alternative mating tactics and variation in the body size of males are generally reproductive strategies that minimize physical combat with rivals, conferring advantages to larger males regarding access to females, as observed in *Centris pallida* (Alcock, Jones et al., 1977), *Perdita portalis* (Danforth, 1991), and *Amegilla dawsoni* (Alcock, 1997). However, in the present study, male size did not influence copulation success; both large and small males had the same success. This suggests that *E. dejeanii* females are not immediately “captured” by the larger males, thus enabling both tactics to be effective and coexist.

Mating behavior

The mean time of copulation in *E. dejeanii* was slightly lower than that recorded for *E. bicolor*, which averaged 2.9 min (Rocha-Filho et al., 2008). However, this seems to be a variable aspect, at least among Centridini species, since a much longer average copulation times (6.99 min and 6.45 ± 5.70 min) were recorded for two species of this tribe, *Centris burgdorfi* (Sabino et al., 2017) and *E. nigrita* (Martins et al., 2019), respectively. According to Thornhill and Alcock (1983) the time spent in the copulation process may indicate some types of copulatory mechanisms, such as protection of partners and greater vigor in physical combats with males. Protection of the partner is observed in the species *C. burgdorfi*, in which it was observed that the males carry the females about 200 m from the place they emerge, avoiding competition with other males. In *Epicharis bicolor*, the copulation occurs in the same place as the emergence of the females, indicating a type of greater vigor in the combat with other males.

The presence of more than one male trying to mate with a single female, as observed in the present work, has already been recorded for other bees of the Centridini tribe (Alcock, Jones et al., 1977; Martins et al., 2019; Rocha-Filho et al., 2008; Sabino et al., 2017; Thiele & Inouye, 2007). These studies indicate that males are under strong sexual selection to maximize

their individual reproductive success, and that the intensity of this selection is generally related to the degree of abundance of virgin bees (Shuster, 2009). In addition, monogamy, which is a common behavior for most solitary bees, reinforces this idea (Paxton, 2005).

The pattern of movement of the legs, the touch of the antennae, and the sound produced in all copulations observed in this study, may indicate, according to Eberhard (1994), copulatory “dating” that is very common in insects. The movement of the hind legs of males on the abdomens of females may act by inducing the release of anti-attractive odors by females or be involved in the release of odors by males that remain on females, making them less attractive, as suggested for *Centris burgdorfi* (Sabino et al., 2017).

The production of sounds, buzzing, and vibratory signals is common during mating of bees and solitary wasps (Eickwort & Ginsberg, 1980). In this study, it was not possible to distinguish which of the two sexes produces the sound, but is believed to be the male, as demonstrated for other species of solitary bees, such as *Amegilla dawsoni* (Simmons, Tomkins, & Alcock, 2000), *Osmia rufa* Linnaeus 1758 (Conrad, Paxton, Barth, Francke, & Ayasse, 2010), and *Centris burgdorfi* (Sabino et al., 2017), representing a sign of male vigor for the females.

In solitary bees, it is common to observe males sleeping on plant branches and flowers near the nesting area (Frankie et al., 1980), but this is unusual near or in the nests of females (Sabino et al., 2017). In *E. dejeanii* it was not possible to identify where the males spent the night. Thus, future studies are needed to elucidate this issue, since a dormitory in the same area as the nesting site may allow males faster access to virgin females, as suggested for the males of *Centris burgdorfi* (Sabino et al., 2017).

Overall, the present study broadened the understanding of mating behavior and male patrols for mating in the genus *Epicharis*. The results presented evidence that *Epicharis dejeanii* males employ two mating patrol strategies, near the ground and in plants, suggesting that the adopted patrol strategy has an association with the body size of males. This research also shows that both strategies used proved effective in copulation success and that the time of greatest male abundance in the aggregation coincides with the period when females emerged in greater numbers, justifiably when the greatest number of matings occurred. We also concluded that males of this species patrol small territories at the nest aggregation instead of flying across the entire nesting aggregation, a finding that was already described to *E. metatarsalis* (Thiele & Inouye, 2007).

Acknowledgements

We thank to: Robson Rockembacher, Susanna Miranda, and Natália Held for their help in the field; Camila Savada for helping in editing Figure 3; the Chico Mendes Institute for

Biodiversity Conservation (Superagui Island) for support during fieldwork and Dr José Eduardo Lahoz da Silva Ribeiro for plant species identification. We also thank the two anonymous reviewers for their valuable comments.

Disclosure statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. We are grateful to Fundação Araucária and CAPES for the fellowships granted to the third and the fourth authors. L. Souza-Shibatta is a researcher in PNPd (CAPES) fellowship; SH Sofia receives a productivity research fellowship from CNPq (PQ 305343/2018-1).

Supplementary material

A video clip showing male patrolling behavior is available via the 'Supplementary' tab on the article's online page (<http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2020.1733197>).

ORCID

Lenice Souza-Shibatta <http://orcid.org/0000-0001-8097-6895>
Gabriele Antico Freiria <http://orcid.org/0000-0001-8499-6906>
Silvia Helena Sofia <http://orcid.org/0000-0002-3443-0696>

References

- Alcock, J. (1979). The evolution of intraspecific diversity in male reproductive strategies in some bees and wasps. In M. S. Blum & N. A. Blum (Eds.), *Sexual selection and reproductive competition in insects* (pp. 381–402). New York, NY: Academic Press.
- Alcock, J. (1997). Competition from large males and the alternative mating tactics of Dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni* (Apidae, Apinae, Anthophorini). *Journal of Insect Behavior*, 10(1), 99–113. doi:10.1007/BF02765477
- Alcock, J. (2013). Sexual selection and the mating behavior of solitary bees. *Advances in the Study of Behavior*, 45, 1–48.
- Alcock, J., Bailey, W. J., & Simmons, L. W. (2010). The mating system of *Amegilla* (*Asarapoda*) *paracalva* brooks (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 23(1), 69–79. doi:10.1007/s10905-009-9196-x
- Alcock, J., & Buchmann, S. L. (2011). The mating system of *Habropoda pallida* Timberlake (Anthophorinae: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 24(5), 348–362. doi:10.1007/s10905-011-9261-0
- Alcock, J., Eickwort, G. C., & Eickwort, K. R. (1977). The reproductive behavior of *Anthidium maculosum* (Hymenoptera: Megachilidae) and the evolutionary significance of multiple copulation by females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2(4), 385–396. doi:10.1007/BF00299507
- Alcock, J., Jones, C. E., & Buchmann, S. L. (1977). Male mating strategies in the bee *Centris pallida* Fox (Anthophoridae: Hymenoptera). *The American Naturalist*, 111(977), 145–165. doi:10.1086/283145
- Alcock, J., Jones, C. E., & Buchmann, S. L. (2009). Location before emergence of the female bee, *Centris pallida*, by its male (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of Zoology*, 179(2), 189–199. doi:10.1111/j.1469-7998.1976.tb02290.x
- Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Bergström, O., & Tengö, J. (1978). Linalool in mandibular gland secretion of *Colletes* bees (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of Chemical Ecology*, 4, 437–449. doi:10.1007/BF00989500
- Carvalho, F. L., & Raw, A. (2017). Specialized diet of the solitary bee *Epicharis rustica* (Apoidea, Centridini): Importance of the tree *Byrsonima sericea*. *Revista Brasileira de Entomologia*, 61(1), 99–100. doi:10.1016/j.rbe.2016.12.001
- Cane, J. (1987). Estimation of bee size using intertegular span (Apoidea). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 60, 145–147.
- Conrad, T., Paxton, R. J., Barth, F. G., Francke, W., & Ayasse, M. (2010). Female choice in the red mason bee, *Osmia rufa* (L.) (Megachilidae). *The Journal of Experimental Biology*, 213(Pt 23), 4065–4073. doi:10.1242/jeb.038174
- Coville, R. E., Frankie, G. W., Buchmann, S. L., Vinson, S. B., & Williams, H. J. (1986). Nesting and male behavior of *Centris heithausi* (Hymenoptera: Anthophoridae) in Costa Rica with chemical analysis of the hindleg glands of males. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 59, 325–336.
- Danforth, B. N. (1991). The morphology and behavior of dimorphic males in *Perdita portalis* (Hymenoptera: Andrenidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 29(4), 235–247. doi:10.1007/BF00163980
- Eberhard, W. G. (1994). Evidence for widespread courtship during copulation in 131 species of insects and spiders, and implications for cryptic female choice. *Evolution*, 48(3), 711–733. doi:10.1111/j.1558-5646.1994.tb01356.x
- Eickwort, G. C., & Ginsberg, H. S. (1980). Foraging and mating behavior in Apoidea. *Annual Review of Entomology*, 25(1), 421–446. doi:10.1146/annurev.en.25.010180.002225
- Frankie, G. W., Vinson, S. B., & Coville, R. E. (1980). Territorial behavior of *Centris adani* and its reproductive function in the Costa Rican dry forest (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 53, 837–857.
- Gaglianone, M. C. (2001). Nidificação e forrageamento de *Centris* (*Ptilotopus*) *scopipes* Friese (Hymenoptera, Apidae) [Nesting biology and foraging behavior of *Centris* (*Ptilotopus*) *scopipes* Friese (Hymenoptera, Apidae)]. *Revista Brasileira de Zoologia*, 18(suppl 1), 107–117. doi:10.1590/S0101-81752001000500008
- Gaglianone, M. C. (2005). Nesting biology, seasonality, and flower hosts of *Epicharis nigrita* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Centridini), with a comparative analysis for the genus. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 40(3), 191–200. doi:10.1080/01650520500250145
- Gross, M. R. (1996). Alternative reproductive strategies and tactics: Diversity within sexes. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 92–98. doi:10.1016/0169-5347(96)81050-0
- Hiller, B., & Wittmann, D. (1994). Seasonality, nesting biology and mating behavior of the oil-collecting bee *Epicharis dejeana* (Anthophoridae, Centridini). *Biociências*, 2, 107–124.
- Inouye, B. D. (2000). Use of visual and olfactory cues for individual nest hole recognition by the solitary bee *Epicharis metatarsalis* (Apidae, Anthophorinae). *Journal of Insect Behavior*, 13(2), 231–238.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO). (2016). *Unidades abertas à visitação: Parque Nacional do Superagui [Open Visitation Units: Superagui National Park]*. Retrieved from <http://www.icmbio.gov.br>
- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES). (2001). *Zonamento da Área de Proteção Ambiental de Guaquecaba, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social, Curitiba [Zoning of Guaquecaba Environmental Protection Area, Paranaense Institute of Economic and Social Development, Curitiba]*. Retrieved from http://www.ipardes.gov.br/biblioteca/docs/zonamento_apa.pdf
- Martins, C. F., Santos, V. I., & Cruz, R. D. M. (2019). Nesting biology and mating behavior of the solitary bee *Epicharis*

- nigrita* (Apoidea: Centridini). *Journal of Apicultural Research*, 58(4), 512–521. doi:10.1080/00218839.2019.1584963
- Medeiros, P. C. R., & Schlindwein, C. (2003). Territórios de machos, acasalamento, distribuição e relação com plantas em *Protomeliturga turnerae* (Ducke, 1907) (Hymenoptera, Andrenidae) [Male territories, mating, distribution and relation to plants in *Protomeliturga turnerae* (Ducke, 1907) (Hymenoptera, Andrenidae)]. *Revista Brasileira de Entomologia*, 47, 589–596. doi:10.1590/S0085-56262003000400009
- Moure, J. S. (1945). Notas sobre Epicharitina (Hymenoptera, Apoidea) [Notes on Epicharitina (Hymenoptera, Apoidea)]. *Revista Brasileira de Entomologia*, 16, 293–314. doi:10.1590/S0085-56262003000100011
- Moure, J. S., Melo, G. A. R., & Vivallo, F. (2012). Centridini Cockerell & Cockerell, 1901. In J. S. Moure, D. Urban, & G. A. R. Melo (Orgs.), *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region*. Retrieved from <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>
- Oliveira, R., & Schlindwein, C. (2010). Experimental demonstration of alternative mating tactics of males of *Ptilothrix fructifera* (Hymenoptera, Apidae). *Animal Behaviour*, 80(2), 241–247. doi:10.1016/j.anbehav.2010.04.024
- Paxton, R. J. (2005). Male mating behaviour and mating systems of bees: An overview. *Apidologie*, 36(2), 145–156. doi:10.1051/apido:2005007
- Raw, A. (1992). Mate searching and population size of two univoltine solitary species of the bee genus *Epicharis* (Hymenoptera) in Brazil with records of threats to nesting populations. *The Entomologist*, 111, 1–9.
- Rocha-Filho, L. C., Silva, C. I., Gaglianone, M. C., & Augusto, S. C. (2008). Nesting behavior and natural enemies of *Epicharis (Epicharis) bicolor* Smith 1854 (Hymenoptera Apidae). *Tropical Zoology*, 21, 227–242.
- Roitberg, B., & Isman, M. B. (Eds). (1992). *Insect chemical ecology: An evolutionary approach*. New York, NY: Chapman & Hall.
- Roubik, D. W. (1989). *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Roubik, D. W., & Michener, C. D. (1980). The seasonal cycle and nests of *Epicharis zonata*, a bee whose cells are below the wet season water table (Hymenoptera, Anthophoridae). *Biotropica*, 12(1), 56–60. doi:10.2307/2387773
- Rozen, J. G. Jr. (2016). Nesting biology of the solitary bee *Epicharis albofasciata* (Apoidea: Apidae: Centridini). *American Museum Novitates*, 3869(3869), 1–8. doi:10.1206/3869.1
- RStudio Team. (2015). RStudio: Integrated development for R. Boston: RStudio. Retrieved from <http://www.rstudio.com/>
- Rutowski, R., & Alcock, J. (1980). Temporal variation in male copulatory behaviour in the solitary bee *Nomadopsis puellae* (Hymenoptera: Andrenidae). *Behaviour*, 73(3-4), 175–187. doi:10.1163/156853980X00212
- Sabino, W. O., Silva, C. I., & Alves-dos-Santos, I. (2017). Mating system and sleeping behaviour of the male and female *Centris (Paracentris) burgdorfi* Friese (Apidae, Centridini). *Journal of Insect Behavior*, 30, 103–118. doi:10.1007/s10905-017-9600-x
- Schmidlin, L. A. J., Accioly, A., Accioly, P., & Kirchner, F. F. (2005). Mapeamento e caracterização da vegetação da Ilha de Superagui utilizando técnicas de geoprocessamento [Mapping and characterization of Superagui Island vegetation applying geoprocessing techniques]. *Floresta*, 35(2), 303–315. doi:10.5380/rev.v35i2.4618
- Shuster, S. M. (2009). Sexual selection and mating systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement_1), 10009–10016. doi:10.1073/pnas.0901132106
- Silveira, F. A., Melo, G. A. R., & Almeida, E. A. B. (2002). *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação [Brazilian bees: Systematics and identification]* (1st ed.). Belo Horizonte: Fernando A. Silveira.
- Simmons, L. W., Tomkins, J., & Alcock, J. (2000). Can minor males of Dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni* (Hymenoptera: Anthophorini) compensate for reduced access to virgin females through sperm competition? *Behavioral Ecology*, 11(3), 319–325. doi:10.1093/beheco/11.3.319
- Thiele, R., & Inouye, B. D. (2007). Nesting biology, seasonality, and mating behavior of *Epicharis metatarsalis* (Hymenoptera: Apidae) in Northeastern Costa Rica. *Annals of the Entomological Society of America*, 100(4), 596–602.
- Thornhill, R., & Alcock, J. (1983). *The evolution of insect mating systems*. Cambridge: Harvard University Press.
- Uemura, N. (2017). *Estrutura do ninho e atividades de nidificação de Epicharis (Anepicharis) dejeanii (Apidae, Centridini) na Ilha do Superagui, sul do Brasil [Nest structure and nesting activities of Epicharis (Anepicharis) dejeanii (Apidae, Centridini) in Superagui Island, Southern Brazil]* (Dissertação [Dissertation]). Mestrado em Ciências Biológicas (Master in Biological Sciences). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CAPÍTULO 2

Análise integrada genética e dos hidrocarbonetos cuticulares desvenda aspectos do processo reprodutivo de *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini), uma abelha solitária Neotropical

Este capítulo está nas normas da revista *Zoological Journal of the Linnean Society*.

Análise integrada genética e dos hidrocarbonetos cuticulares desvenda aspectos do processo reprodutivo de *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini), uma abelha solitária

Título reduzido: Reconhecimento molecular em *Epicharis dejeanii*

Welber da Costa Pina^{1,2,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, CBB, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

²Universidade do Estado da Bahia, Teixeira de Freitas, BA, Brazil

*Autor correspondente: Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, 86057-970, Londrina, PR, Brazil - Email: costapina@gmail.com; Telefone: + 55 4333714437

Resumo

Análises integrando diferentes metodologias podem constituir ferramentas valiosas na busca de respostas para uma gama de abordagens biológicas, tal como estudos envolvendo aspectos comportamentais. Neste estudo, utilizou-se os marcadores moleculares genéticos e análises dos hidrocarbonetos cuticulares (HCs) para investigar o possível papel dos HCs no mecanismo de sinalização química e no reconhecimento de parentesco durante o processo reprodutivo da abelha solitária Neotropical *Epicharis dejeanii*, a qual exibe protândria, ciclo de vida univoltino e hábito de nidificar em agregações. Os espécimes foram amostrados, na Ilha do Superagui, no Sul do Brasil, durante duas estações reprodutivas consecutivas (novembro/dezembro de 2017 e 2018). Nas análises genéticas, 45 machos e 35 fêmeas (totalizando N = 80) foram genotipados para 12 loci microssatélites. Adicionalmente, caracterizou-se os HCs destes indivíduos, por meio de um sistema de cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massa. Os dados revelam altos níveis de diversidade genética e baixo nível de endogamia no agregado. As variações quantitativas e qualitativas dos HCs permitem diferenciar os sexos, e as fêmeas virgens das fêmeas já acasaladas, mas não diferenciam os machos que empregam diferentes estratégias de buscas por fêmeas para acasalar. A análise do perfil de HCs, entre parentes e não parentes, demonstrou que os compostos cuticulares avaliados são capazes de permitir distinção entre os grupos. Assim, reforçados pela ausência de parentesco nos casais analisados, os HCs são potencialmente importantes e podem estar atuando no reconhecimento de parentes em *E. dejeanii*, mantendo a diversidade genética e minimizando possíveis efeitos nocivos que podem decorrer de um alto nível de endogamia, como a depressão endogâmica.

Palavras-Chave: Microssatélites; reconhecimento; sinalização química, parentesco genético

INTRODUÇÃO

Nas abelhas, a nidificação em agregados e a filopatria podem fornecer benefícios evolutivos à população sob certas condições, diminuindo, por exemplo, os altos custos de dispersão (Bonte, 2012) e aumentando a probabilidade do encontro de parceiros, quando as densidades populacionais são baixas (Matthysen, 2005). Por outro lado, é esperado que ambos os comportamentos possam levar à altos níveis de endogamia (Paxton et al., 1996), resultando em possíveis aumentos da proporção de homozigotos, diminuindo os níveis de diversidade genética individual (Hartl & Clark, 1997) e possível redução do nível de aptidão do indivíduo (Freeland, 2005), além de uma depressão endogâmica na população (Allendorf et al., 2012).

A intensidade de depressão por endogamia varia amplamente entre os grupos de animais e pode ser influenciada pelas particularidades de sua genética. As abelhas são insetos haplodiploides, com um reconhecido mecanismo de determinação complementar do sexo de loco único (*csd*), multialélico. Os heterozigotos, no loco de determinação do sexo, desenvolvem-se em fêmeas diploides, a partir de ovos fertilizados; os hemizigotos em machos haploides, a partir de ovos não fertilizados (Beye et al., 2003; Zayed, 2009). Assim, quando uma fêmea acasala com um macho haploide, que compartilha o mesmo alelo determinante do sexo (homozigoto), ao invés de fêmea nascem machos diploides (Beye et al., 2003; van Wilgenburg et al., 2006).

A maioria dos machos diploides são estéreis ou inviáveis (Heimpel & de Boer, 2008), contudo, se forem viáveis e se acasalarem, produzirão óvulos fertilizados inviáveis ou filhas triploides estéreis (Krieger et al., 1999; Ayabe et al., 2004). Como consequência, a produção de tais machos pode levar a uma redução na taxa de crescimento populacional (Pamilo & Crozier, 1997) e a um grande custo genético para as populações de abelhas (Zayed, 2009), tornando a determinação de sexo complementar em haplodiploides uma importante ameaça genética à viabilidade populacional (Zayed & Packer, 2005; Hedrick et al., 2006). Entretanto, estudos com abelhas de comportamento solitário e com nidificações em agregados têm apresentado baixo índice de endogamia (Beveridge & Simmons, 2006; López-Uribe et al., 2015), sugerindo algum tipo de mecanismo evolutivo para evitar encontros entre parentes, como a dispersão e o reconhecimento prévio de parentesco (Pusey & Wolf, 1996; López-Uribe et al., 2015).

A dispersão pode ser realizada pelos indivíduos de um ou ambos os sexos, para evitar acasalamentos entre parentes. Contudo, ela pode ser energeticamente dispendiosa, expor o indivíduo a parasitas, predadores e habitats desconhecidos e, ainda, diminuir a adaptação genética local (Bateson, 1983). Além do mais, em abelhas, a capacidade de se dispersar está diretamente relacionada ao tamanho corpóreo, de modo que abelhas pequenas percorrem menores distâncias, enquanto as grandes deslocam-se mais (Greenleaf *et al.*, 2007; Cariveau *et al.*, 2016). Paralelamente, um outro possível mecanismo para prevenção de altos níveis de endogamia em espécies de abelhas é o reconhecimento prévio de parentesco. Nestes insetos, tal reconhecimento é predominantemente químico (Howard, 1993), por meio de hidrocarbonetos cuticulares (HCs) ou feromônios (Smith, 1983; Wcislo, 1992). Estes hidrocarbonetos são substâncias cerosas sendo, frequentemente, o grupo estrutural mais abundante da epicutícula dos insetos (Kather *et al.*, 2011), com enorme significado funcional na prevenção à dessecação, no aumento à proteção contra patógenos (Genin *et al.*, 1986) e, secundariamente, na comunicação química (Blomquist *et al.*, 1987; Buckner, 1993; Nelson & Blomquist, 1995). Estudos têm demonstrado que insetos que exibem intensa competição entre machos pelas fêmeas virgens, os machos são atraídos pelos hidrocarbonetos cuticulares e feromônios sexuais liberados pelas fêmeas, preferindo os odores das fêmeas não aparentadas e de diferentes populações (Wcislo, 1997; Vereecken *et al.*, 2007; Pölkki *et al.*, 2012; van Bergen *et al.*, 2013; Menzel *et al.*, 2016).

Para muitos organismos, a qualidade do parceiro pode afetar o sucesso reprodutivo, ou seja, parceiro com melhor fitness adaptativo pode fornecer benefícios ambientais, como exemplo, recursos ou benefícios genéticos para sua prole (Parker, 1983; Thornhill & Alcock, 1983), pois o sistema de acasalamento também influencia na prevenção da endogamia (Foster, 1992).

As abelhas Neotropicais do gênero *Epicharis* Cockerell & Cockerell, com 35 espécies, estão distribuídas em nove subgêneros (Moure *et al.*, 2012), e o comportamento de nidificar em agregações no solo é um hábito frequentemente relatado (Roubik & Michener, 1980; Hiller & Wittmann, 1994; Gaglianone, 2002, 2005; Thiele & Inouye, 2006; Rocha-Filho *et al.*, 2008; Gaglianone *et al.*, 2015; Rozen, 2016; Dec & Vivallo, 2019).

Fêmeas do gênero *Epicharis* fazem parte de um grupo de abelhas conhecido como “abelhas coletoras de óleo”, que reúne cerca de 400 espécies (Alves-dos-

Santos *et al.*, 2007; Gaglianone *et al.*, 2011). As fêmeas coletam óleo em flores e utilizam este recurso para alimentar larvas e revestir células de cria (Neff & Simpson, 1981; Alves-dos-Santos *et al.*, 2007). Os machos que visitam às flores para se alimentar, também podem ali encontrar suas parceiras para cópula e, ainda, possivelmente, utilizam o óleo floral para rituais de corte (Neff & Simpson, 2017).

As agregações de *Epicharis* frequentemente contêm uma grande densidade de ninhos e várias centenas de fêmeas em um local (Thiele & Inouye, 2006; Rozen, 2016), podendo, em alguns casos, ocupar uma grande área em toda sua extensão, a exemplo de *Epicharis (Anepicharis) dejeanii* Lepeletier (Hiller & Wittmann, 1994; Pina *et al.*, 2020), única representante deste subgênero (Moure *et al.*, 2012), sendo uma espécie solitária, univoltina, protândrica e com relatos de ocorrência apenas para a América do Sul (Hiller & Wittmann, 1994; Moure *et al.*, 2012; Dec & Vivallo, 2019).

Em *Epicharis*, é usual o relato de vários machos vistos sobrevoando a agregação, exibindo intensa competição intraespecífica e diferentes estratégias de patrulhamento que possibilitam maior acesso às fêmeas virgens (Hiller & Wittmann, 1994; Gaglianone, 2005; Thiele & Inouye, 2007; Rocha-Filho *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2019; Pina *et al.*, 2020). No caso de *E. dejeanii*, os machos empregam duas estratégias de patrulha para o acasalamento: machos maiores patrulham nas plantas e os menores perto do chão, na área de nidificação (Pina *et al.*, 2020).

Conhecer o processo de acasalamento de uma espécie pode ser fundamental para fornecer informações sobre os processos evolutivos que moldam o seu comportamento, morfologia e história de vida (Page, 1986; Beveridge *et al.*, 2006). Embora relevantes, dados obtidos apenas por meio da observação direta do comportamento de acasalamento de uma espécie podem ser mascarados pela própria limitação do método, devendo ser usados em conjunto com outros métodos para que sejam mais completos e confiáveis. Neste sentido, o uso de análises genéticas, com base em marcadores moleculares, associada a uma análise de hidrocarbonetos cuticulares de machos e fêmeas de abelhas podem constituir abordagens valiosas na tentativa de elucidar o papel dos compostos químicos (ex. HCs) e possível interferência na seleção de parceiros para o acasalamento.

Assim, devido às características ecológicas e comportamentais de *E. dejeanii*, a abordagem no estudo combinou, pela primeira vez para uma abelha solitária Neotropical, uma investigação buscando informações por meio de marcadores

genéticos. altamente polimórficos, e análise de perfil de hidrocarbonetos, para testar se: (1) *E. dejeanii* apresenta uma alta taxa de endogamia populacional, (2) os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) diminuem a probabilidade de acasalamento entre parentes e, (3) o estágio reprodutivo da fêmea influencia na composição do perfil de HCs. Os objetivos desta pesquisa foram: i) investigar o possível papel dos HCs no mecanismo de reconhecimento de parentesco para evitar a endogamia em uma agregação de ninhos na ilha do Superagui; ii) avaliar o uso combinado dos HCs e marcadores genéticos em investigações envolvendo o comportamento de cópula em abelhas nidificando em agregações; iii) verificar se os perfis de HCs são utilizados para discriminação sexual nesta espécie; e iv) verificar se os HCs, nas fêmeas, sinalizam um novo *status* durante seu ciclo de vida e, nos machos, diferenciam as duas estratégias de patrulha na busca por acasalamento no agregado.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Machos e fêmeas de *E. dejeanii* foram coletadas em uma agregação de ninhos em uma área de restinga na Ilha do Superagui (25°27'51.4"S, 48°14'07.1"W), uma ilha artificial, com extensão de 11.000 ha, localizada no município de Guaraqueçaba, litoral Norte do estado do Paraná, Sul do Brasil. A ilha é integrante do Parque Nacional do Superagui, sendo uma das Unidades de Conservação da Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba (ICMBIO, 2016). Segundo a classificação de Köppen, o clima da ilha é caracterizado como subtropical úmido, mesotérmico (IPARDES, 2001) e a vegetação é caracterizada por uma combinação de Floresta Ombrófila Densa e formações pioneiras, como a restinga (Schmidlin *et al.*, 2005).

As abelhas foram coletadas em dois anos consecutivos, 2017 e 2018, durante os meses de novembro e dezembro, considerados meses de pico do período reprodutivo da espécie na ilha (Uemura, 2017). As coletas incluíram a captura com rede entomológica de machos que patrulhavam a área da agregação de ninhos à procura de fêmeas para acasalamento e fêmeas durante as atividades de nidificação e provisionamento de células. Adicionalmente, fêmeas virgens foram coletadas em

vinte armadilhas, constituídas por uma armação que foi coberta por uma tela de tecido fino e transparente que ficava apoiada no solo, medindo 1,5m x 1,0m x 0,50m, distribuídas aleatoriamente pela agregação dos ninhos (Werneck, 2012, com modificações). Posteriormente, todas as abelhas coletadas foram acondicionadas, individualmente, em tubos plásticos cônicos, do tipo Falcon, de 50ml, sacrificadas em gelo e acondicionadas em *freezer* (-20 °C).

Análises Químicas

Para caracterização dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares de *E. dejeanii*, foram analisados 53 indivíduos distribuídos em cinco grupos: i) 10 machos que patrulhavam em voo rente ao solo (± 20 cm); ii) 10 machos que patrulhavam em voo no topo de árvores; iii) 20 fêmeas nidificando (fêmeas em processo de construção de ninho e/ou provisionamento de células de crias); iv) sete fêmeas virgens (recém emergidas); e v) seis casais que estavam acasalando (coletadas logo após a cópula, quando se soltavam (ver Pina et al., 2020). Os indivíduos coletados foram retirados do *freezer*, deixados em temperatura ambiente e lavados com jatos de água destilada. Para as fêmeas, as pernas posteriores foram retiradas para evitar contaminação com substâncias coletadas no campo (por exemplo, óleo e resina). Logo após a retirada das pernas, as fêmeas foram devolvidas ao *freezer* por 30 min para evitar contaminação com fluidos internos dos indivíduos.

A metodologia de análises de HCs foi baseada em Tanure-Nascimento *et al.* (2007). A extração dos compostos químicos foi conduzida com a imersão dos indivíduos em tubos de ensaios contendo 2mL do solvente hexano (Sigma-Aldrich $\geq 99\%$), por dois minutos. Após a retirada dos indivíduos, o solvente foi transferido, com auxílio de uma pipeta, para vials (frascos) de 2mL. Os vials foram deixados em local protegido, à temperatura ambiente para evaporação do solvente, logo em seguida, foram identificados e armazenados no *freezer* até o momento da leitura em cromatógrafo à gás e espectrômetro de massa, quando, então, as amostras foram ressuspendidas em 200 μ L de hexano.

Os hidrocarbonetos foram identificados com base em seus espectros de massas e com o auxílio de duas soluções padrões de alcanos lineares (C8-C20 e C21-C40, Sigma-Aldrich). Além disso, a posição da dupla ligação dos alcenos e alcadienos foram identificadas através da derivatização das amostras, de acordo

com a metodologia proposta por Carlson *et al.* (1989). As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM) da Universidade Estadual de Londrina e no Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Análises Genéticas

A extração de DNA foi realizada por meio do método fenol-clorofórmio, seguindo o protocolo de Giangarelli *et al.* (2015), a partir da musculatura do tórax de 80 indivíduos (45 machos + 35 fêmeas). Previamente, a musculatura foi lavada em álcool 70%, após sua retirada, para a remoção de eventuais contaminantes. Após extração, o DNA obtido foi ressuspendido em 50 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) e armazenado em *freezer* a -20 °C. A quantificação das amostras foi realizada em Nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c). Para as análises, as amostras foram diluídas em água ultrapura para a concentração de 5ng/µL.

Para as amplificações dos locos microssatélites foram selecionados 12 *primers* (*Ed51, Ed54, Ed63, Ed72, Ed74, Ed77, Ed78, Ed80, Ed83, Ed89, Ed90, Ed92*) desenvolvidos para *Epicharis dejeanii* (Souza-Shibatta *et al.*, 2021). As amplificações dos locos foram realizadas em volume final de 10 µL, contendo: 1X GoTaq Green Master Mix (Promega), 10 ng da amostra de DNA, 1% de glicerol, 0,125 µM de *primer* M13 marcado com fluorescência (FAM, HEX, NED ou PET, Applied Biosystems, CA), 0,125 µM de *primer Reverse*, 0,0125 µM de *primer Forward* e água ultrapura para completar o volume final. A reação foi feita em ciclo realizado em termocicladores (PCT-100 Peltier Thermal Cycler MJ Research Inc.e Multigen LabNetBios), de acordo com o protocolo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguidos de 10 ciclos consistindo de três etapas: desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento para cada *primer*, por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto; seguidos por mais 25 ciclos de três etapas: 89 °C por 30 segundos, anelamento por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. A extensão final foi a 72 °C por 30 minutos.

Os produtos da PCR foram diluídos na proporção de 1:10 em H₂O, em 2 µL desta diluição foram acrescentados 0,15 µL do marcador de peso molecular GeneScan LIZ600 (Applied Biosystems) e 7,85 µL de Formamida Hi-Di (Applied

Biosystems). As genotipagens dos fragmentos foram realizadas em sequenciador automático, modelo Applied Biosystems® 3500 xL Genetic Analyzer. Os eletroferogramas foram analisados no Micro Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004). As análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA) e no LAMM da Universidade Estadual de Londrina.

Análise dos dados

Para os perfis de HCs, os compostos que estiveram ausentes em menos que 50% nos indivíduos pertencentes para um grupo ou que contribuíam em menos de 0,5% no total de compostos foram excluídos das análises (Valadares & Nascimento, 2016, 2017). Os dados foram normalizados e transformados por raiz quadrada e uma matriz de semelhança (Distância Euclidiana) foi calculada. Uma Análise de Coordenadas Principais (PCO) foi realizada para visualização das similaridades ou dissimilaridades das amostras e grupos. Uma análise de variância PerMANOVA com 9999 permutações, teste post-hoc, foi utilizada para comparação dos perfis químicos cuticulares dos grupos de fêmeas e machos analisados (Valadares & Nascimento, 2017).

Nas análises genéticas, a caracterização da diversidade genética das amostras coletadas na agregação de ninhos foi feita calculando o número total de alelos (N_a), o número médio de alelos efetivos (N_e) e a heterozigosidade observada e esperada (H_o e H_e), utilizando o *software* GenAlEx 6.5 no Microsoft Excel (Peakall & Smouse, 2012). O coeficiente de endogamia (F_{IS}) e a riqueza alélica (A_r) foram estimados no programa FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). Apenas fêmeas foram utilizadas para os cálculos do F_{IS} , H_o e H_e .

A verificação do poder dos marcadores microssatélites para inferir relação de parentesco foi feita usando o *software* KinInfor v.1 (Wang, 2006) e as análises de parentescos foram realizadas por dois *softwares*: COANCESTRY v.1.0.1.1 (Wang, 2010) e COLONY v.2.0.4.4 (Jones & Wang, 2010). O COANCESTRY opera apenas com dados diploides, por isso a partir do estimador de parentesco de Queller e Goodnight (QGt) (Queller & Goodnight, 1989) estimou-se a relação de parentesco entre as fêmeas da agregação. A escolha deste estimador se deu porque a análise do KinInfor o identificou como aquele que possui o maior poder de detecção de parentesco para conjunto de dados. O COLONY, que opera com dados

haplodiploides, foi utilizado para estimar a relação de parentesco entre os casais coletados durante a cópula. O COLONY foi executado com método de alta precisão, assumindo um sistema de acasalamento poligâmico para os machos e monogâmico para as fêmeas e ausência de endogamia (López-Urbe *et al.*, 2015).

A partir das análises de parentesco do estimador QGt, foi calculada a distância (Euclidiana) de similaridade dos perfis de HCs entre as fêmeas mais aparentadas (probabilidade $\geq 50\%$) e as não aparentadas (probabilidade $\leq 1\%$), e um teste t de Student foi utilizado para comparar as distâncias entre estes dois grupos. Para as análises de PCO e PerMANOVA e para o teste t de Student foi utilizado o *software* Past v. 3.12 (Hammer *et al.*, 2001). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

As análises de hidrocarbonetos cuticulares (HCs) identificaram a presença de 37 compostos extraídos dos corpos de machos e fêmeas de *E. dejeanii*, constituídos pelo conjunto de alcanos lineares e ramificados, alcenos e alcadienos (Tabela 1). O comprimento das cadeias de HCs variou de 21 a 33 átomos de carbonos. Dos 37 compostos encontrados, 14 hidrocarbonetos foram exclusivos das fêmeas, enquanto 7 foram exclusivos dos machos. Os alcanos lineares estiveram presentes em todos os grupos, os alcanos ramificados (metilados) foram exclusivos das fêmeas e a classe dos alcenos foi a que apresentou uma maior distinção entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão da proporção relativa de hidrocarbonetos cuticulares da abelha solitária Neotropical, *Epicharis dejeanii*.

Composto	TR ⁻	MPP ⁺	MPS ⁺	FNI ⁺	FVE ⁺	FRA ⁺
(z [†])-9-Heneicosene	16.226	4,49 ± 2,75	3,78 ± 2,27	-	-	-
(z)-7-Heneicosene	16.365	0,76 ± 0,55	0,60 ± 0,46	-	-	-
(n [†])-Heneicosane	16.913	0,59 ± 0,24	0,48 ± 0,24	0,13 ± 0,07	0,32 ± 0,13	0,24 ± 0,08
(z)-9-Tricosene	21.906	2,55 ± 1,36	2,46 ± 1,34	0,31 ± 0,39	0,69 ± 0,62	0,81 ± 0,57
(n)Tricosane	22.728	0,84 ± 0,23	0,78 ± 0,25	7,33 ± 1,79	7,68 ± 1,03	6,00 ± 0,76
(n)Tetracosane	25.934	0,36 ± 0,15	0,26 ± 0,06	0,45 ± 0,10	0,55 ± 0,15	0,35 ± 0,04
(z)-a-Pentacosene	28.140	-	-	0,26 ± 0,19	0,92 ± 0,39	0,49 ± 0,58
(z)-9-Pentacosene	28.259	0,61 ± 0,26	0,68 ± 0,27	3,32 ± 1,92	1,78 ± 0,76	2,43 ± 0,81
(z)-7-Pentacosene	28.511	0,26 ± 0,13	0,30 ± 0,17	0,69 ± 0,30	0,24 ± 0,38	0,16 ± 0,05
(n)Pentacosane	29.148	1,15 ± 0,30	1,06 ± 0,39	12,07 ± 2,03	11,59 ± 2,52	8,82 ± 1,53
(n)Hexacosane	32.422	0,40 ± 0,06	0,40 ± 0,06	0,4 ± 0,09	0,63 ± 0,14	0,45 ± 0,09
(z)-a-Heptacosene	34.606	-	-	1,47 ± 0,82	2,07 ± 0,79	2,26 ± 1,17
(z)-11,9-Heptacosene	34.727	-	-	4,13 ± 2,13	2,68 ± 0,61	4,36 ± 1,16
(z)-13,11,9,7,5-Heptacosene	34.947	9,38 ± 2,83	10,34 ± 2,73	-	-	-
(z)-13,12,8,7-Heptacosene	34.967	-	-	1,48 ± 0,54	0,46 ± 0,38	0,92 ± 0,20
(z)-8-Heptacosene	35.194	4,92 ± 1,17	5,14 ± 2,39	-	-	-
(n)Heptacosane	35.797	13,00 ± 1,97	12,66 ± 1,17	12,3 ± 1,99	21,53 ± 6,76	15,15 ± 3,98
(z)-9,8,7-Octacosene	38.170	1,42 ± 0,18	1,41 ± 0,20	-	-	-
(n)Octacosane	38.973	0,42 ± 0,11	0,37 ± 0,06	0,33 ± 0,09	0,67 ± 0,08	0,43 ± 0,05
(z,z [†])-9,19-Nonacosadieno	40.556	-	-	0,7 ± 0,40	0,36 ± 0,21	0,75 ± 0,43
(z,z)-8,20-Nonacosadieno	40.789	0,90 ± 1,11	1,59 ± 1,65	0,68 ± 0,27	0,32 ± 0,09	0,85 ± 0,40
(z,z)-7,21-Nonacosadieno	40.799	6,03 ± 2,01	7,99 ± 3,54	-	-	-
(z)-14,13,12,11,9-Nonacosene	41.183	-	-	8,2 ± 4,53	6,57 ± 2,45	7,94 ± 1,66
(z)-14,13,12,11,10,9-Nonacosene	41.536	35,35 ± 4,73	33,58 ± 5,87	-	-	-
(z)-7,5-Nonacosene	41.568	-	-	8,02 ± 2,95	9,21 ± 3,02	12,76 ± 2,09

(z)-8,7- Nonacosene	41.763	4,78 ± 1,45	4,42 ± 1,06	4,31 ± 1,40	2,07 ± 0,67	1,81 ± 0,22
(n)Nonacosane	42.232	6,23 ± 1,71	5,65 ± 1,29	7,1 ± 1,86	10,60 ± 0,80	7,82 ± 1,27
15,13,11-Trimetilnonacosane	43.081	-	-	0,09 ± 0,10	0,44 ± 0,16	0,32 ± 0,12
(z,z)-9,21-Hentriacontadieno	46.851	0,54 ± 0,34	0,35 ± 0,23	1,72 ± 0,62	0,76 ± 0,39	0,92 ± 0,29
(z,z)-8,22-Hentriacontadieno	46.951	-	-	0,73 ± 0,27	0,32 ± 0,18	0,35 ± 0,17
(z,z)-a [‡] ,b [‡] -Hentriacontadieno	47.164	-	-	0,52 ± 0,32	0,37 ± 0,12	0,57 ± 0,35
(z)- 15, 14, 13-Hentriacontene	47.447	-	-	9,32 ± 4,87	5,77 ± 1,39	7,39 ± 1,50
(z)- 12, 11, 10, 9, 8, 7-Hentriacontene –	47.819	-	-	4,12 ± 1,18	4,01 ± 1,35	4,52 ± 1,58
(z)-7-Hentriacontene	47.941	0,02 ± 0,05	-	1,49 ± 0,46	1,03 ± 0,32	1,03 ± 0,63
(n)Hentriacontane	48.380	0,16 ± 0,16	0,11 ± 0,09	1,3 ± 0,46	1,69 ± 0,22	0,93 ± 0,22
(z)- 16,15,14,13,12,11,10,9,8-Tritriaconteno	53.339	-	-	2,14 ± 0,94	0,80 ± 0,32	0,99 ± 0,29
(z)-a- Tritriaconteno	53.715	-	-	0,32 ± 0,19	0,54 ± 0,19	0,55 ± 0,28

[‡]TR = tempo de retenção;

[†]MPP = machos patrulhadores de plantas; MPS = machos patrulhadores de solo; FNI = fêmeas nidificando; FVE = fêmeas virgens emergentes; FRA = fêmeas recém acasaladas;

[‡] (n) = alcanos; (z) = alcenos; (zz) = alcadienos; (a,b) = local da dupla ligação indefinido.

A análise de coordenadas principais (PCO) apresentou uma clara separação dos sexos (Figura 1). Análises *post hoc* dos grupos apontaram uma diferença significativa entre fêmeas e machos (PerMANOVA, $F=118,18$, $p < 0,001$). A análise de PCO demonstra também, que as fêmeas virgens emergentes são distintas das demais fêmeas (PerMANOVA, $F=5,7924$, $p < 0,001$). Para os machos que adotam diferentes patrulhas em buscas de parceiras no agregado não houve separação dos grupos (PerMANOVA, $F=0,65336$, $p > 0,6332$).

As fêmeas virgens emergentes, diferentemente dos demais grupos, apresentaram uma proporção de alcanos lineares maior do que a proporção de alcenos. Este grupo de fêmeas também apresentou a maior proporção de alcanos metilados. As fêmeas recém acasaladas tiveram proporções semelhantes de alcanos lineares e alcenos com as fêmeas que estavam nidificando. Os machos de patrulhas diferentes tiveram as proporções de hidrocarbonetos cuticulares semelhantes, embora os machos patrulhadores em plantas apresentaram uma maior proporção de alcadienos que os demais grupos (Figura 2).

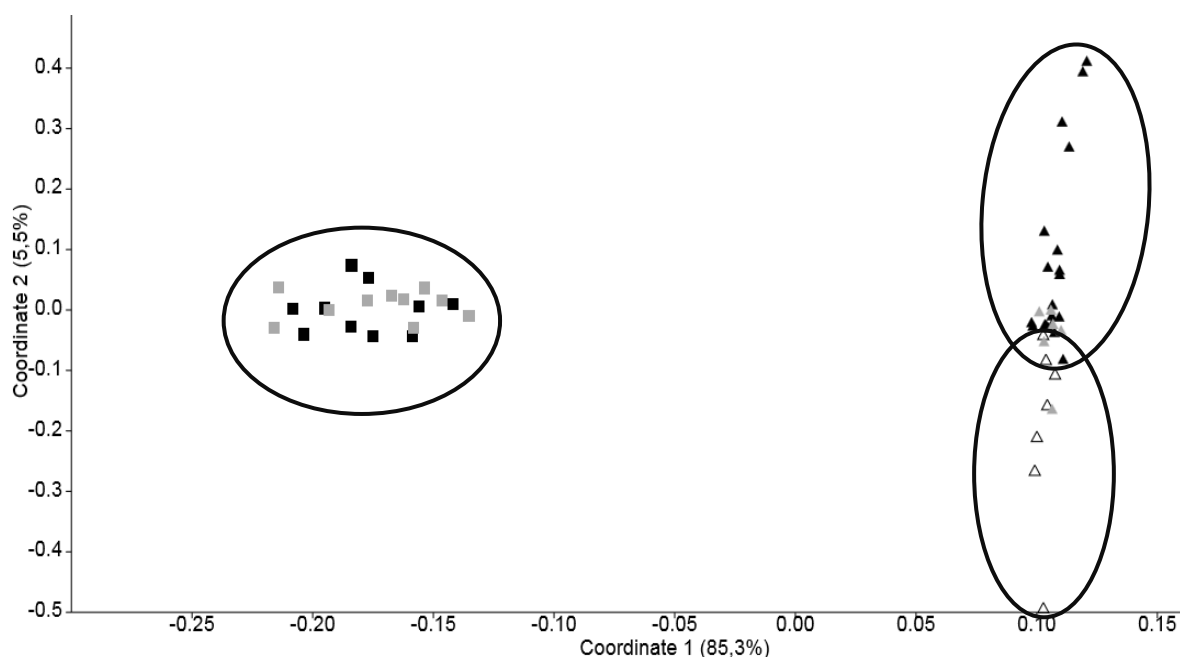


Figura 1. Análise de componentes principais (PCO) realizada com hidrocarbonetos cuticulares da abelha *Epicharis dejeanii* (quadrados pretos = machos patrulhadores de plantas; quadrados cinzas = machos patrulhadores de solo; triângulos pretos = fêmeas nidificando; triângulos cinzas sem preenchimento = fêmeas virgens emergentes; triângulos cinzas = fêmeas recém acasaladas).

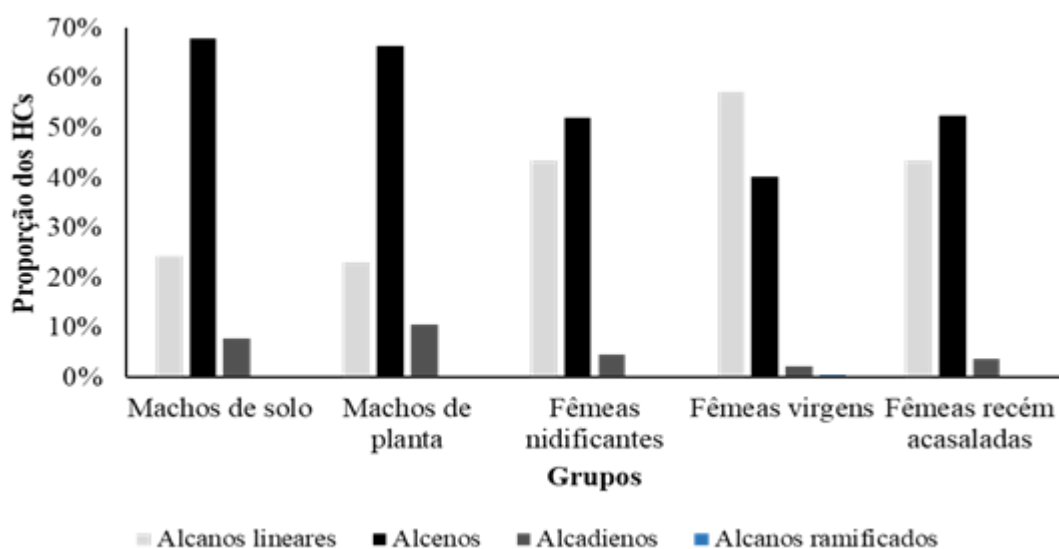


Figura 2. Proporção (%) dos compostos de hidrocarbonetos separados por classe para cada grupo da abelha solitária *E. dejeanii*.

Em relação a diversidade genética obtida para as amostras de fêmeas e machos de *E. dejeanii*, o número total de alelos (N_a) observados foi 118, o número médio de alelos efetivos (N_e) foi 3,095 e da riqueza alélica (A_r) foi 9,868. A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram 0,485 e 0,603,

respectivamente. O coeficiente de endogamia (F_{is}), após a correção de Bonferroni, apresentou valores não significativos ($p = 0,185$).

A análise entre o par de macho e fêmea de cada um dos seis casais coletados após término imediato da cópula, indicaram ausência completa de relação de parentesco entre estes. Por outro lado, as fêmeas aparentadas apresentaram maior similaridade dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares que as fêmeas não aparentadas ($t = -2,2429$; $p = 0,039418$; Figura 3).

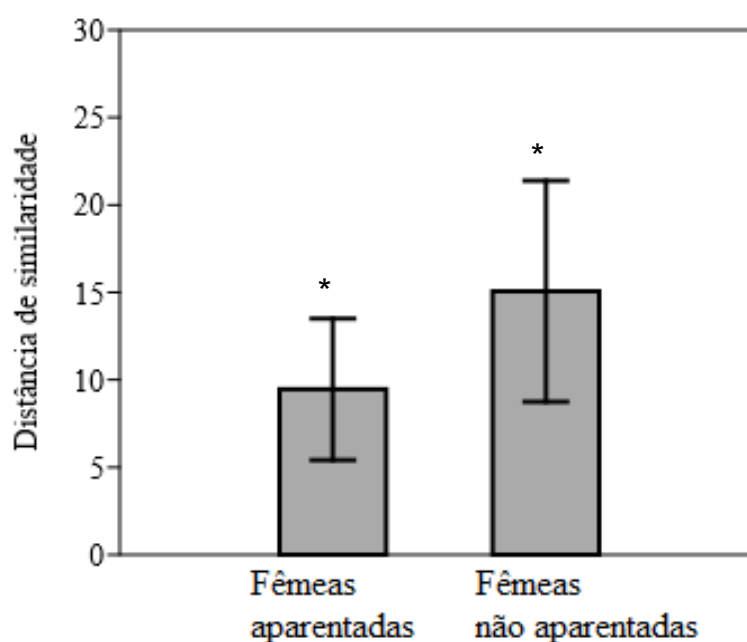


Figura 3. Distância (Euclidiana) de similaridade dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares entre os grupos de fêmeas da abelha *E. dejeanii*. (Fêmeas aparentadas = fêmeas com probabilidade $\geq 50\%$ de serem parentes; fêmeas não aparentadas = fêmeas com probabilidade $\leq 1\%$ de serem parentes; barra representa o desvio padrão; * representa diferença significativa).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelaram que os perfis de HCs foram capazes de distinguir entre os dois sexos de *E. dejeanii* e estão de acordo com vários estudos na literatura realizados com espécies de abelhas solitárias, como *Andrena nigroaenea* Kirby (Schiestl *et al.*, 1999), *Megachile rotundata* Fabricius (Paulmier *et al.*, 1999) e *Amegilla dawsoni* Rayment (Simmons *et al.*, 2003) que também revelaram perfis distintos em machos e fêmeas, indicando, portanto, que os HCs desempenham um papel funcional, provavelmente, relevante na discriminação química para o reconhecimento dos dois sexos em uma espécie.

Embora *E. dejeanii* seja uma espécie protândrica, há um período em que machos e fêmeas emergem ao mesmo tempo, existindo várias dezenas de indivíduos voando e uma grande competição dos machos pelo acesso às fêmeas emergentes (Dec & Vivalo, 2019, 2020; Pina *et al.*, 2020). Assim, a capacidade de diferenciar os sexos pelo perfil de HCs tem uma vantagem seletiva para os machos, porque reduz tanto os gastos energéticos de sobrevivência quanto custos associados ao tempo despendido na procura por fêmeas virgens (Simmons *et al.*, 2003).

No presente estudo verificou também que os HCs nas fêmeas apresentaram dimorfismo quantitativo e qualitativo durante o processo de acasalamento, isto é, fêmeas virgens foram claramente distinguidas de fêmeas acasaladas em *E. dejeanii*. Isso ocorreu por uma redução na proporção de alcanos em favor do aumento na proporção de alcenos. A transição do perfil de hidrocarbonetos cuticulares aconteceu em pouco tempo, logo após a cópula.

Embora estudos realizados com abelhas solitárias indiquem que as fêmeas acasaladas diminuem ou cessam a produção de HCs, que sinalizam receptividade e passam a produzir compostos que inibem o comportamento de acasalamento dos machos (Schiestl & Ayasse, 2000; Simmons *et al.*, 2003), esta mudança pode ser resultado do processo desencadeado pela idade, em uma ação ontogenética autônoma. Em *Osmia bicornis* e *O. cornuta*, por exemplo, a transição ocorre puramente pela fase do ciclo de vida da abelha, não havendo diferenças nos perfis de HCs de fêmeas virgens e acasaladas da mesma idade (Seidelmann & Rolke, 2019). Também um estudo sobre atratividade sexual em *Megachile rotundata* acentuou a importância da idade para mudanças no perfil químico (Paulmier *et al.*,

1999).

No entanto, a transição do perfil autônomo do HCs está associada com a diminuição dependente da idade e com a proporção de fêmeas virgens que aceitam copular com um machos (Seidelmann, 2014). Assim, existe uma pequena janela de receptividade ao acasalamento após a emergência da fêmea, sugerindo que uma sinalização química possa resultar na garantia da fêmea em receber suprimento de esperma para reprodução e para estimular a competição entre os machos patrulhadores, como foi sugerido por Simmons *et al.* (2003) para a abelha solitária *Amegilla dawsoni*.

A estratégia de patrulha de acasalamento adotada em machos de *Epicharis dejeanii* tem associação com o tamanho corporal, os machos maiores realizam patrulha no topo das plantas e os menores rente ao solo, no agregado de ninhos (Pina *et al.*, 2020). Contudo, nossos resultados demonstraram que os machos de *E. dejeanii* de tamanhos corporais diferentes não apresentam distinção nos seus perfis de HCs, sugerindo que o maior acesso na tentativa de cópulas com as fêmeas, provavelmente, não esteja relacionado a estes compostos químicos. Por outro lado, a presença e a quantidade de machos patrulhando em buscas por cópulas, pode influenciar na composição e aumentar a atratividade dos compostos cuticulares, como já relatado para moscas (Gershman *et al.*, 2014; Gershman & Rundle, 2016, 2017) e ortópteros (Genin *et al.*, 1986; Heifetz *et al.*, 1998). De forma diversa, os resultados com as análises de HCs aqui obtidos não permitem tal conclusão para *E. dejeanii*.

As classes dos HCs são bem conhecidas por desempenhar um papel em numerosas interações intraespecíficas mediadas quimicamente (Geiselhardt *et al.*, 2012; Weiss *et al.*, 2013). Nesta pesquisa, o padrão geral de HCs encontrado está em conformidade com perfis encontrados para outras espécies de abelhas solitárias (Buckner *et al.*, 2009; Pitts-Singer *et al.*, 2017; Seidelmann & Rolke, 2019). Alcanos e alcenos de números ímpares também dominam o perfil de HCs da abelha solitária *Amegilla dawsonia*, que nidifica em agregação no solo, além das fêmeas acasaladas serem distinguidas das virgens por uma redução de alcanos em favor dos alcenos (Simmons *et al.*, 2003).

Em *E. dejeanii*, os alcenos foram mais abundantes, o que pode estar relacionado à feromônios sexuais e no processo de acasalamento, como em outras abelhas solitárias, tais como *Colletes cunicularius* Linnaeus (Mant *et al.* 2005),

Andrena nigroaenea (Schiestl *et al.*, 1999), *Habropoda pallida* Timberlake (Saul-Gershenz & Millar, 2006) e *Megachile rotundata* (Paulmier *et al.*, 1999), refletindo seu papel na comunicação química destes insetos.

Os alcanos lineares foram representativos na cutícula das fêmeas, especialmente nas virgens. Estes alcanos, de acordo com Blomquist e Bagnères (2010), são compostos que possuem mais de 20 carbonos nas cadeias e não são voláteis e, por isso, não podem atuar como sinais emitidos e recebidos a certa distância. Apesar disto, Tannure-Nascimento *et al.* (2007) e Brito *et al.* (2017) sugerem que estes compostos tenham importância como sinais para mediar interações coespecíficas, podendo atuar como feromônio de superfície, o que explicaria a alta ocorrência destes compostos nas fêmeas virgens. Paralelamente, tem sido proposto também que estes alcanos lineares estejam envolvidos na construção de uma barreira para evitar a perda de água (Arnold & Regnier, 1975; Menzel *et al.*, 2017). Assim, por essas duas funções desempenhadas, é justificável a grande ocorrência destes hidrocarbonetos no presente estudo.

Feromônios de contato de curto alcance são usados por muitos insetos para identificar e, potencialmente, discriminar outros indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes (Wyatt, 2013). Como em outros insetos, o reconhecimento de parceiros em *E. dejeanii* é mediado por sinais químicos e, provavelmente, a presença de hidrocarbonetos cuticulares, fisiologicamente ativos, sejam necessários para induzir o comportamento copulatório, enquanto outros compostos agem como um atrativo sexual de longo alcance, que aumentam a probabilidade do início do acasalamento, como demonstrado para outras abelhas solitárias (Cane & Tengö, 1981; Larsen *et al.*, 1986; Schiestl & Ayasse, 2000; Candolin, 2003).

Os hidrocarbonetos cuticulares são quimicamente estáveis, com baixa volatilidade (Howard & Blomquist, 2005) e estão envolvidos no reconhecimento de parentesco em diversos insetos (Simmons, 1989; Keller & Fournier, 2002; Lihoreau *et al.*, 2007; Oppelt *et al.*, 2008; Thomas & Simmons, 2008) e, ainda parecem oferecer um indicador confiável do genótipo contido em um indivíduo (Thomas & Simmons, 2008). Neste estudo houve diferença nos perfis de HCs de fêmeas aparentadas e não aparentadas, indicando que há um possível envolvimento dos HCs na discriminação de indivíduos aparentados. Adicionalmente, a ausência de parentesco nos casais analisados reforça esta ideia. Este resultado, está em concordância com outras pesquisas que envolveram estes compostos cuticulares

em abelhas solitárias, como por exemplo os machos de *Colletes cunicularius* que usam os HCs tanto para discriminar quanto para optar por fêmeas de um outro agregado (Vereecken et al., 2007), enquanto em *Manuelia postica* Spinola as fêmeas utilizam para reconhecer suas irmãs de ninho (Flores-Prado et al., 2008). Contudo, não se pode descartar a existência de outros mecanismos para o reconhecimento de parentes em *E. dejeanii*, uma vez que este tipo de reconhecimento pode depender de outros compostos químicos, como compostos voláteis de baixo peso molecular derivados da glândula de Dufour, e estes não podem ser removidos simplesmente pelo hexano (Simmons et al., 2003). Paralelamente, uma associação entre um conjunto de características morfológicas, químicas e comportamentais, não avaliados neste trabalho, também deve ser considerada.

No presente estudo, foram observados altos níveis de diversidade genética e baixo nível de endogamia na população de *E. dejeanii*, resultados que estão de acordo com outros estudos realizados em abelhas solitárias e que também nidificam em agregados (Beveridge & Simmons, 2006; Lopez-Úrbe et al., 2015). Em abelhas, o tamanho corpóreo está diretamente relacionado a sua capacidade de voo (Greenleaf et al., 2007; Cariveau et al., 2016). Como o gênero *Epicharis* é constituído por abelhas consideradas grandes, com tamanhos entre 15 a 25 mm de comprimento (Michener, 2007), as fêmeas são supostamente filopátricas e com ciclo de vida univoltino (Hiller & Wittmann, 1994; Uemura, 2017; Dec & Vivallo, 2019), é possível que os machos de *E. dejeanii* estejam sendo capazes de se dispersarem para pontos mais distantes dentro de agregações de grande tamanho em extensão ou até para outras agregações na ilha, o que, conseqüentemente, elevaria o fluxo gênico na agregação de ninhos e diminuiria os níveis de acasalamentos entre irmãos, reduzindo o risco de depressão por endogamia da população (López-Urbe et al., 2015).

Provavelmente, devido à fidelidade aos sítios natais das fêmeas e características adequadas deste solo arenoso, propício para nidificação, é que esta agregação de ninhos persista no mesmo local por vários anos seguidos (Uemura, 2017; Pina et al., 2020). Contudo, um fator que pode reduzir a estabilidade desta população de abelha, a longo prazo, são os altos níveis de endogamia, entretanto este agente limitante não esteve presente neste estudo. Contudo, evitar a urbanização (que pode impactar negativamente os níveis locais e regionais de fluxo

gênico em abelhas nativas (Jha & Kremen, 2013; Lopéz-uribe *et al.*, 2015) e limitar o turismo em áreas restritas na Ilha do Superagui, possam fornecer subsídios importantes para preservação, conservação e expansão desta população na Ilha.

Em suma, pode-se concluir que *E. dejeanii* tem um sistema de HCs envolvido na discriminação dos sexos, de fêmeas virgens/acasaladas e que, aparentemente, eles desempenham um papel na discriminação de indivíduos mais aparentados, como observado entre fêmeas, atuando, portanto, em diferentes formas de reconhecimento químico. Os resultados aqui apresentados representam uma importante contribuição para o entendimento de mecanismos envolvidos no sistema de acasalamento em espécies de abelhas solitárias que nidificam em agregações.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 e CNPq. L. Souza-Shibatta é pesquisador bolsista PNPd (CAPES); SH Sofia recebe bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq (PQ 305343 / 2018-1). Agradecemos a: Robson Rockembacher, Natalia Uemura, Susanna Miranda e Natália Held pela ajuda em campo; Caroline Silva, Thais Kotelok e Wilson Frantine pela ajuda na genotipagem das abelhas; ao Dr. Paulo C. Ricardo, à Dr^a. Maria C. Gaglianone (UENF) e à Dr^a Maria C. Arias (USP) pelo suporte do desenvolvimento da biblioteca genômica para obtenção dos locos microssatélites; ao Dr. Fabio Santos do Nascimento (USP – Ribeirão Preto) e Amanda Prato (FFCLRP-USP) pelo auxílio valioso nas análises dos hidrocarbonetos cuticulares; ao Laboratório Multiusuário de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM) da UEL pelo suporte nas realizações das análises genéticas e químicas, em especial à pesquisadora Sara Godoy e à técnica Cristina Lopes; Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Ilha do Superagui) pelo apoio ao trabalho de campo.

REFERÊNCIAS

- Allendorf FW, Luikart GH, Aitken SN. 2012. *Conservation and the genetics of populations* (2nd ed.). West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Alves-dos-Santos I, Machado IC, Gaglianone MC. 2007. História Natural das abelhas coletoras de óleo, *Oecologia Brasiliensis* 11: 544-557.
- Arnold MT, Regnier FE. 1975. A developmental study of the cuticular hydrocarbons of *Sarcophaga bullata*, *Journal of Insect Physiology* 21: 1827-1833.
- Ayabe T, Hoshiba H, Ono M. 2004. Cytological evidence for triploid males and females in the bumblebee, *Bombus terrestris*, *Chromosome Research* 12: 215-223.
- Bateson P. 1983. Optimal Outbreeding. In: Bateson PPG, ed, *Mate Choice*. Cambridge: Cambridge University Press, 257-277.
- Beveridge M, Simmons L. 2006. Panmixia: an example from Dawson's burrowing bee (*Amegilla dawsoni*) (Hymenoptera: Anthophorini), *Molecular Ecology* 15: 951-957.
- Beveridge M, Simmons L, Alcock, J. 2006. Genetic breeding system and investment patterns within nests of Dawson's burrowing bee (*Amegilla dawsoni*) (Hymenoptera: Anthophorini), *Molecular Ecology* 15: 3459-3467.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honey bee and encodes a new SR-type protein, *Cell* 114: 419-429.
- Blomquist GJ, Bagnères AG. 2010. *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology*. New York: Cambridge University Press.
- Blomquist GJ, Nelson DR, Renobales M. 1987. Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 6: 227-265.
- Bonte D, van Dyck H, Bullock JM, Coulon A, Delgado M, Gibbs M. 2012. Costs of dispersal, *Biological Reviews* 87: 290-312.
- Brito JH, Antonialli-Junior WF, Montagna TS, Mendonça A, Sguarizi-Antonio D, Suárez YR, Cardoso CA. 2017. Linear alkanes and reproductive status of *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae) females in winter aggregates, *Sociobiology* 64: 327-333.
- Buckner JS. 1993. Polar cuticular lipids. In: Stanley-Sameulson DW, Nelson DR,

eds, *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. Lincoln: University of Nebraska Press, 227-270.

- Buckner JS, Pitts-Singer TL, Guedot C, Hagen MM, Fatland CL, Kemp WP.** 2009. Cuticular lipids of female solitary bees, *Osmia lignaria* Say and *Megachile rotundata* (F.) (Hymenoptera: Megachilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 153: 200-205.
- Candolin U.** 2003. The use of multiple cues in mate choice, *Biological Reviews* 78: 575-595.
- Cane JH, Tengö J.** 1981. Pheromonal cues direct mate seeking behaviour of male *Colletes cunicularius* (Hymenoptera, Colletidae), *Journal of Chemical Ecology* 7: 427-436.
- Cariveau DP, Nayak GK, Bartomeus I, Zientek J, Ascher JS, Gibbs J, Winfree R.** 2018. The Allometry of Bee Proboscis Length and Its Uses in Ecology, *PLoS ONE* 13: e0207900.
- Carlson DA, Roan CS, Yost RA, Hector J.** 1989. Dimethyl disulfide derivatives of long chain alkenes, alkadienes, and alkatrienes for gas chromatography/mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 61: 1564-1571.
- Dec E, Vivallo F.** 2019. Nesting biology and immature stages of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini), *Apidologie* 50: 606-615.
- Dec E, Vivallo F.** 2020. Reproductive behavior of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii* (Apidae: Centridini), *Apidologie* doi.org/10.1007/s13592-020-00825-7
- Flores-Prado L, Aguilera-Oliveira D, Niemeyer HM.** 2008. Nest-mate recognition in *Manuelia postica* (Apidae: Xylocopinae): an eusocial trait is present in a solitary bee, *Proceedings of the Royal Society B* 275: 285-291.
- Foster RL.** 1992. Nestmate recognition as an inbreeding avoidance mechanism in Bumble bees (Hymenoptera: Apidae), *Journal of the Kansas Entomological Society* 65: 238-243.
- Freeland JR.** 2005. *Molecular Ecology*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Gaglianone MC.** 2002. Uma análise comparativa da nidificação de espécies de *Epicharis*. In: *Anais do V Encontro sobre Abelhas*. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 47-52.
- Gaglianone MC.** 2005. Nesting biology, seasonality, and flower hosts of *Epicharis nigrita* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae: Centridini), with a comparative analysis for the genus, *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 40: 191-

200.

- Gaglianone MC, Aguiar AJC, Vivallo F, Alves-dos-Santos I. 2011.** Checklist das abelhas coletoras de óleos do estado de São Paulo, Brasil, *Biota Neotropica* 11: 657-666.
- Gaglianone MC, Werneck HA, Campos LAO. 2015.** Univoltine life cycle of two species of *Epicharis Klug*, 1807 (Apidae, Centridini) and notes on their cleptoparasites *Tetraonyx* spp. (Coleoptera, Meloidae). In: Aguiar AJC, Gonçalves RB, Ramos KS, eds. *Ensaio sobre as Abelhas da Região Neotropical: Homenagem aos 80 Anos de Danúncia Urban*. Curitiba: Editora da Universidade Federal do Paraná, 401-414.
- Geiselhardt S, Otte T, Hilker M. 2012.** Looking for a similar partner: host plants shape mating preferences of herbivorous insects by altering their contact pheromones, *Ecology Letter* 15: 971-977.
- Genin E, Jullien R, Perez F. 1986.** Cuticular hydrocarbons of gregarious and solitary locusts *Lacusta nigrotatoria cinerascens*, *Journal of Chemical Ecology* 12: 1213-1238.
- Gershman SN, Delcourt M, Rundle HD. 2014.** Sexual selection on *Drosophila serrata* male pheromones does not vary with female age or mating status, *Journal of Evolutionary Biology* 27: 1279-1286.
- Gershman SN, Rundle HD. 2016.** Level up: the expression of male sexually selected cuticular hydrocarbons is mediated by sexual experience, *Animal Behaviour* 112: 169-177.
- Gershman SN, Rundle HD. 2017.** Crowd control: sex ratio affects sexually selected cuticular hydrocarbons in male *Drosophila serrate*, *Journal of Evolutionary Biology* 30: 583-590.
- Giangarelli DC, Freiria GA, Ferreira DG, Aguiar WM, Penha RES, Alves AN, Gaglianone MC, Sofia SH. 2015.** Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators, *Apidologie* 46: 606-617.
- Goudet J. 2001.** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). [Software]. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso em: 04/03/2020
- Greenleaf SS, Williams NM, Winfree R, Kremen C. 2007.** Bee Foraging Ranges and Their Relationship to Body Size, *Oecologia* 153: 589-596.

- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001.** PAST Paleontological Statistics software package for education and data analysis, *Palaeontol Electronica* 4: 1-9.
- Hartl DL, Clark GC. 1997.** *Principles of Population Genetics* (3rd ed). Sunderland, England: Sinauer Associates.
- Hedrick PW, Gadau J, Page REJ. 2006.** Genetic sex determination and extinction, *Trends in Ecology & Evolution* 21: 55-57.
- Heifetz Y, Miloslavski I, Aizenshtat Z, Applebaum S. 1998.** Cuticular surface hydrocarbons of desert locust nymphs, *Schistocerca gregaria*, and their effect on phase behavior, *Journal of Chemical Ecology* 24: 1033-1047.
- Heimpel GE, Boer JG. 2008.** Sex determination in the Hymenoptera, *Annual Review of Entomology* 53: 209-230.
- Hiller B, Wittmann D. 1994.** Seasonality, nesting biology and mating behavior of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii* (Anthophoridae, Centridini), *Biociências* 2:107-124.
- Howard RW. 1993.** Cuticular hydrocarbon and chemical communication. In: Stanley-Samuelson DW, Nelson DR, eds. *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*. Lincoln: University of Nebraska Press, 179-226.
- Howard RW, Blomquist GJ. 2005.** Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons, *Annual Review of Entomology* 50:371-393.
- ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2016.** *Unidades abertas à visitação: Parque Nacional do Superagui*. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br>. Acesso em: 12/11/2019.
- IPARDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. 2001.** *Zoneamento da Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba*. Curitiba, Brasil: Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social.
- Jha S, Kremen C. 2013.** Urban land use limits regional bumble bee gene flow. *Molecular Ecology* 22: 2483-2495.
- Jones OR, Wang J. 2010.** COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data, *Molecular Ecology Resour* 10: 551-555.
- Kather R, Drijfhout FP, Martin SJ. 2011.** Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*, *Journal of Chemical Ecology* 37: 205-212.
- Keller L, Fournier D. 2002.** Lack of inbreeding avoidance in the Argentine ant *Linepithema humile*, *Behavioral Ecology* 13: 28-31
- Kocher SD, Richard FJ, Tarpay DR, Grozinger CM. 2008.** Genomic analysis of post-

- mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*), *BMC Genomics* 9: 232.
- Kocher SD, Tarpy DR, Grozinger CM. 2010.** The effects of mating and instrumental insemination on queen honey bee flight behaviour and gene expression, *Insect Molecular Biology* 19: 153-162.
- Krieger MJB, Ross KG, Chang CW, Keller L. 1999.** Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*, *Heredity* 82: 142-150.
- Larsen O, Gleffe G, Tengö J. 1986.** Vibration and sound communication in solitary bees and wasps, *Physiological Entomology* 11: 287-296.
- Lihoreau M, Zimmer C, Rivault C. 2007.** Kin recognition and incest avoidance in a group-living insect, *Behavioral Ecology* 18: 880-887.
- López-Urbe MM, Morreale SJ, Santiago CK, Danforth BN. 2015.** Nest Suitability, Fine-Scale Population Structure and Male-Mediated Dispersal of a Solitary Ground Nesting Bee in an Urban Landscape, *PLoS ONE* 10: e0125719.
- Mant J, Brändli C, Vereecken NJ, Schulz CM, Francke W, Schiestl FP. 2005.** Cuticular hydrocarbons as sex pheromone of the bee *Colletes cunicularius* and the key to its mimicry by the sexually deceptive orchid *Ophrys exaltata*, *Journal of Chemical Ecology* 31: 1765-1787.
- Martins CF, Santos VI, Cruz RDM. 2019.** Nesting biology and mating behavior of the solitary bee *Epicharis nigrita* (Apoidea: Centridini), *Journal of Apicultural Research* 58: 512-521.
- Matthysen E. 2005.** Density-dependent dispersal in birds and mammals, *Ecography* 28: 403–416.
- Menzel F, Blaimer BB, Schmitt T. 2017.** How do cuticular hydrocarbons evolve? Physiological constraints and climatic and biotic selection pressures act on a complex functional trait, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284: 20161727.
- Menzel F, Radke R, Foitzik S. 2016.** Odor diversity decreases with inbreeding in the ant *Hypoponera opacior*, *Evolution* 70: 2573-2582.
- Michener CD. 2007.** *Bees of the world* (2nd ed.). Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.
- Moure JS, Melo GAR, Vivallo F. 2012.** Centridini cockerel & cockerell, 1901. In: Moure JS, Urban D, Melo GAR, eds. *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region*. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 27/02/2020.

- Neff JL, Simpson BB. 1981.** Oil-collecting structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): morphology, function and use in systematics, *Journal of the Kansas Entomological Society* 54: 95-123.
- Neff JL, Simpson BB. 2017.** Vogel's great legacy: The oil flower and oil-collecting bee syndrome, *Flora* 232: 104-116.
- Nelson DR, Blomquist GJ. 1995.** Insect waxes. In: Hamilton RJ, ed. *Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*. Dundee: Oily Press, 1-90.
- Oppelt A, Spitzenpfeil N, Kroiss J, Heinze J. 2008.** The significance of intercolonial variation of cuticular hydrocarbons for inbreeding avoidance in ant sexuals, *Animal Behaviour* 76: 1029-1034.
- Page RE. 1986.** Sperm utilization in social insects, *Annual Review of Entomology* 31: 297-320.
- Pamilo P, Crozier RH. 1997.** Population biology of social insect conservation, *Memoirs of Museum Victoria* 56: 411-419.
- Parker GA. 1983.** Mate quality and mating decisions. In: Bateson PPG, ed. *Mate Choice*. Cambridge: Cambridge University Press, 141-164.
- Paulmier I, Bagnères AG, Afonso CMM, Dusticier G, Rivière G, Clément JL. 1999.** Alkenes as a sexual pheromone in the alfalfa leaf-cutter bee *Megachile rotundata*, *Journal of Chemical Ecology* 25: 471-490.
- Paxton R, Thorén P, Tengo J, Estoup A, Pamilo P. 1996.** Mating structure and nestmate relatedness in a communal bee, *Andrena jacobii* (Hymenoptera, Andrenidae), using microsatellites, *Molecular Ecology* 5:511-519.
- Peakall R, Smouse PE. 2012.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update, *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pina WC, Souza-Shibatta L, Uemura N, Gobatto AL, Freiria GA, Sofia SH. 2020.** Male strategies and mating behavior in the Neotropical bee *Epicharis (Anepicharis) dejeanii* (Apidae: Centridini), *Journal of Apicultural Research* doi.org/10.1080/00218839.2020.1733197.
- Pitts-Singer TL, Hagen MM, Helm BR, Highland S, Buckner JS, Kemp WP. 2017.** Comparison of the chemical compositions of the cuticle and Dufour's gland of two solitary bee species from laboratory and field conditions. *Journal of Chemical Ecology* 43: 451-468.

- Pölkki M, Krams I, Kangassalo K, Rantala MJ. 2012.** Inbreeding affects sexual signalling in males but not females of *Tenebrio molitor*, *Biology Letters* 8: 423-425.
- Pusey A, Wolf M. 1996.** Inbreeding avoidance in animals, *Trends in Ecology & Evolution* 11: 201-206.
- Queller DC, Goodnight KF. 1989.** Estimating relatedness using genetic markers *Evolution* 43: 258-275.
- Rocha-Filho LC, Silva CI, Gaglianone MC, Augusto SC. 2008.** Nesting behavior and natural enemies of *Epicharis (Epicharis) bicolor* Smith 1854 (Hymenoptera Apidae), *Tropical Zoology* 21: 227-242.
- Roubik DW, Michener CD. 1980.** The seasonal cycle and nests of *Epicharis zonata*, a bee whose cells are below the wet season water table (Hymenoptera, Anthophoridae), *Biotropica* 12: 56–60.
- Rozen, JG Jr. 2016.** Nesting biology of the solitary bee *Epicharis albofasciata* (Apoidea: Apidae: Centridini), *American Museum Novitates* 3869: 1–8.
- Saul-Gershenz LS, Millar JG. 2006.** Phoretic nest parasites use sexual deception to obtain transport to their host's nest, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 14039–14044.
- Schiestl FP, Ayasse M. 2000.** Post-mating odor in females of the solitary bee, *Andrena nigroaenea* (Apoidea, Andrenidae), inhibits male mating behavior, *Behavioral Ecology and Sociobiology* 48: 303-307.
- Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W. 1999.** Orchid pollination by sexual swindle, *Nature* 399: 421-422.
- Schmidlin LAJ, Accioly A, Accioly P, Kirchner FF. 2005.** Mapeamento e caracterização da vegetação da Ilha do Superagüi utilizando técnicas de geoprocessamento, *Floresta* 35: 303-315.
- Seidelmann K. 2014.** Behavioural induction of unreceptivity to mating from a post-copulatory display in the red mason bee, *Osmia bicornis*. *Behaviour* 151: 1687-1702.
- Seidelmann K, Rolke D. 2019.** Advertisement of unreceptivity - Perfume modifications of mason bee females (*Osmia bicornis* and *O. cornuta*) and a non-existing antiaphrodisiac. *PLoS One* 14:e0215925.
- Simmons LW. 1989.** Kin recognition and its influence on mating preferences of the field cricket *Gryllus bimaculatus* (De Geer), *Animal Behaviour* 38: 68-77.

- Simmons L, Alcock J, Reeder A. 2003.** The role of cuticular hydrocarbons in male attraction and repulsion by female dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni*, *Animal Behaviour* 66: 677–685.
- Smith BH. 1983.** Recognition of female kin by male bees through olfactory signals, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80: 4551-4553.
- Souza-Shibatta L, Ricardo PC, Pina WC, Flaresso-Neto V, Freiria GA, Kotelok-Diniz T, Gaglianone MC, Arias MC, Sofia SH. 2021.** Isolation and characterization of microsatellite markers in two species of the Neotropical *Epicharis* (Hymenoptera, Apidae, Centridini) genus and cross-amplification in related species, *Molecular Biology Reports* doi: 10.1007/s11033-020-06076-0
- Syvertsen TC, Jackson LL, Blomquist GJ, Vinson SB. 1995.** Alkadienes mediating courtship in the parasitoid *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae), *Journal of Chemical Ecology* 21: 1971-1989.
- Tanaka ED, Hartfelder K. 2004.** The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes, *Arthropod Structure & Development* 33: 431-442.
- Tannure-Nascimento IC, Nascimento FS, Turatti IC, Lopes NP, Trigo JR, Zucchi, R. 2007.** Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a Neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae), *Genetics and Molecular Research* 6: 390-396.
- Thiele R, Inouye BD. 2007.** Nesting biology, seasonality, and mating behavior of *Epicharis metatarsalis* (Hymenoptera: Apidae) in Northeastern Costa Rica, *Annals of the Entomological Society of America* 100: 596-602.
- Thomas ML, Simmons LW. 2008.** Cuticular hydrocarbons are heritable in the cricket *Teleogryllus oceanicus*, *Journal of Evolutionary Biology* 21: 801-806.
- Thornhill R, Alcock J. 1983.** *The evolution of insect mating systems*. Cambridge: Harvard University Press.
- Uemura N. 2017.** Estrutura do ninho e atividades de nidificação de *Epicharis (Anepicharis) dejeanii* (Apidae, Centridini) na Ilha do Superagui, sul do Brasil. Não publicado. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina.
- Valadares L, Nascimento FS. 2016.** Chemical cuticular signature of leafcutter ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae) worker subcastes, *Revista Brasileira de Entomologia* 60: 308-311.
- Valadares L, Nascimento, FS. 2017.** Changes in the cuticular hydrocarbon profile

- associated with the molting cycle correlate with the hydrocarbon profile of the fungus cultivated by the ant *Atta sexdens*, *Insectes Sociaux* 64: 591-596.
- van Bergen E, Brakefield PM, Heuskin S, Zwaan BJ, Nieberding CM. 2013.** The scent of inbreeding: a male sex pheromone betrays inbred males, *Proceedings of the Royal Society B* 280: 20130102.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shiple P. 2004.** Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data, *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- van Wilgenburg E, Driessen G., Beukeboom L. 2006.** Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an “unintelligent” design?, *Frontiers in Zoology* 3: 1-15.
- Vereecken NJ, Mant J, Schiestl FP. 2007.** Population differentiation in female sex pheromone and male preferences in a solitary bee, *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 811-821.
- Wang J. 2006.** Informativeness of genetic markers for pairwise relationship and relatedness inference, *Theoretical Population Biology* 70: 300-321.
- Wang J. 2010.** COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients, *Molecular Ecology Resources* 11: 141-145.
- Wcislo WT. 1987.** The role of learning in the mating biology of a sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae), *Behavioral Ecology and Sociobiology* 20:179-185.
- Wcislo WT. 1992.** Nest localization and recognition in a solitary bee, (*Dialictus figeresi* Wcislo (Hymenoptera: Halictidae), in relation to sociality, *Ethology* 92: 108-123.
- Weiss K, Parzefall C, Herzner G. 2014.** Multifaceted defense against antagonistic microbes in developing offspring of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera. Ampulicidae), *PLoS ONE* 9: e98784.
- Werneck HA. 2012.** Biologia de nidificação, sazonalidade e inimigos naturais de *Epicharis (Epicharoides) picta* (Smith, 1874) (Apidae, Centridini) no município de Viçosa, MG – Brasil. Não publicado. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa.
- Wyatt TD. 2013.** *Pheromones and animal behaviour: Communication by smell and taste*. Cambridge: Cambridge University Press.

Zayed A. 2009. Bee genetics and conservation, *Apidologie* 40: 237-262.

Zayed A, Packer L. 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 10742–10746.

4. CONCLUSÃO GERAL

Este estudo apresenta uma detalhada descrição do comportamento de acasalamento em *Epicharis dejeanii*. Além disso, fornece dados sobre parentesco e reconhecimento genético através da integração entre análises de marcadores microssatélites e hidrocarbonetos cuticulares.

E. dejeanii é uma espécie de importância para a região, em virtude do seu papel desempenhado nos processos ambientais. Embora trabalhos venham sendo realizados sobre essa espécie, identificar outras populações dentro da ilha implicará em novos projetos a serem desenvolvidos em pesquisas futuras, a fim de desvendar mais detalhes do comportamento adaptativo desta espécie na área.

A caracterização do perfil químico juntamente com marcadores microssatélites representam uma importante contribuição para o entendimento de mecanismos envolvidos no sistema de acasalamento e sinalização química, porque colocam em discussão informações sobre os mecanismos contra a depressão endogâmica em uma abelha solitária endêmica da América do Sul. Contudo, também demonstram a importância de maior compreensão sobre as questões ecológicas e comportamentais desta espécie e de outras abelhas solitárias que nidificam em agregações no solo.

Paralelamente, esta pesquisa indica o papel importante da dispersão em *E. dejeanii* na conservação da diversidade genética e da persistência da agregação de ninhos a longo prazo. Contudo, estudos com foco na história natural em abelhas, especialmente as solitárias, possibilitará preencher as lacunas no conhecimento a respeito da filopatria das fêmeas e sua capacidade limitada de dispersão e colonização. Assim, como o papel dos machos na dinâmica populacional de abelhas, visto que são provavelmente os dispersores e fazem as ligações entre populações.

Finalmente, as implicações baseadas nos resultados deste estudo, são relevantes para estratégias de manejo para conservação e preservação da biodiversidade da Ilha do Superagui, e também têm alusões para muitas espécies nativas de abelhas solitárias que compartilham hábitos de vida semelhantes.

APÊNDICES

6.1 APÊNDICE A: Espectrometria de massa da abelha *Epicharis dejeanii*



Espectrometria de massa de um macho de *E. dejeanii*



Espectrometria de massa de uma fêmea virgem de *E. dejeanii*



Espectrometria de massa de uma fêmea acasalada de *E. dejeanii*

6.2 APÊNDICE B: Caracterização dos locos para a população analisada de *Epicharis dejeanii*

Locos	N	Na	Ne	Ho	He	F
ed51	80	6.000	1.729	0.100	0.422	0.763
ed54	80	12.000	2.852	0.275	0.649	0.577
ed63	80	9.000	1.283	0.150	0.220	0.320
ed72	80	6.000	2.337	0.238	0.572	0.585
ed74	80	13.000	5.465	0.375	0.817	0.541
ed77	80	16.000	5.176	0.375	0.807	0.535
ed78	80	2.000	1.311	0.150	0.237	0.368
ed80	80	4.000	2.233	0.263	0.552	0.525
ed83	79	13.000	4.717	0.354	0.788	0.550
ed89	79	11.000	2.066	0.228	0.516	0.558
ed90	80	11.000	3.587	0.300	0.721	0.584
ed92	80	15.000	4.378	0.238	0.772	0.692
Média		9.833	3.095	0.254	0.589	0.550
Désvio padrão		1.284	0.437	0.026	0.061	0.034

N = número de indivíduos genotipados; **Na** = número de alelos; **Ne** = número de alelos efetivos; **Ho** = heterozigosidade observada; **He** = heterozigosidade esperada; **F** = índice de fixação.

6.3 APÊNDICE C: Faz parte desta tese a descrição de locos microssatélite para a espécie *Epicharis dejeanii*. Estes resultados estão incluídos no trabalho

intitulado:

“Isolation and characterization of microsatellite markers in two species of the neotropical *Epicharis* (Hymenoptera, Apidae, Centridini) genus and cross-amplification in related species”

Publicado (online) em 21/01/2021 na Molecular Biology Reports, na forma de short communication

<https://doi.org/10.1007/s11033-020-06076-0>

Deste trabalho participei como um dos autores, atuando nas análises dos locos da espécie *E. dejeanii*

Autores: Lenice Souza-Shibatta · Paulo C. Ricardo · **Welber C. Pina** · Vilmar Flaresso-Neto · Gabrielle A. Freiria · Thais Kotelok-Diniz · Maria C. Gaglianone · Maria C. Arias · Silvia H. Sofia

Abstract

Genetics can provide invaluable tools for management and conservation of bee populations, which are declining worldwide. Among these tools, microsatellite are very useful molecular markers for population analyses. The aim of this study was to isolate and characterize microsatellites for *Epicharis (Anepicharis) dejeanii* and *Epicharis (Epicharis) nigrita*, two Neotropical species of solitary bees, both exhibiting the habit of nesting in aggregations. Microsatellite loci were identified from two enriched genomic libraries. The characterization and analysis of loci were carried out using 35 females of *E. dejeanii* and 34 of *E. nigrita*. In total, we report the development of 12 microsatellite loci for *E. dejeanii* and 13 for *E. nigrita*. For *E. dejeanii*, all loci were polymorphic, the number of alleles per locus ranged from 2 to 12, averaging 8.7 and, observed and expected heterozygosity were 0.485 (range 0.229–0.857) and 0.633 (range 0.288–0.843), respectively. For *E. nigrita*, only nine out of 13 loci amplified were polymorphic, the number of alleles per locus ranged from 2 to 12, averaging 5.5. For this species, the observed and expected heterozygosity were 0.440 (range 0.118–0.676) and 0.545 (range 0.167–0.814), respectively. Cross-amplification of primers was successful in other Centridini species. The two sets of loci described for *E. dejeanii* and *E. nigrita* species are polymorphic and informative and show promising applicability population genetic approaches and relatedness studies on these and other Centridini species.

Author Guidelines

1.1 INTRODUCTION

The *Zoological Journal* publishes papers on systematic and evolutionary zoology and comparative, functional and other studies where relevant to these areas. Studies of extinct as well as living animals are included.

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/1365294x/homepage/forauthors.html>

Acesso em: 20/12/2020

Submission

All manuscripts are submitted and reviewed via ScholarOne. To submit to the journal go to mc.manuscriptcentral.com/zoj. New authors should create an account prior to submitting a manuscript for consideration. Questions about submitting to the journal should be sent to the editorial office at zoeditor@linnean.org.

Peer review process

All submissions to the journal are initially reviewed by the Editor. At this stage manuscripts may be rejected without peer review if it is felt that they are not of high enough priority or not relevant to the journal. This fast rejection process means that authors are given a quick decision and do not need to wait for the review process.

Manuscripts that are not instantly rejected are sent out for peer review, usually to two independent reviewers. Based on the feedback from these reviewers and the Editors' judgment a decision is given on the manuscript. The average time from submission to first decision is five weeks.

If a paper is not acceptable in its present form, we will pass on suggestions for revisions to the author.

For information on the journal's review process or a manuscript's progress, please contact the Managing Editor at zoeditor@linnean.org.

Language Editing Pre-submission

Language editing, particularly if English is not your first language, can be used to ensure that the academic content of your paper is fully understood by the journal editors and reviewers. Please note that edited manuscripts will still need to undergo peer-review by the journal.

Ethics

Authors should observe high standards with respect to publication ethics as set out by the Commission on Publication Ethics (COPE). Falsification or fabrication of data, plagiarism, including duplicate publication of the authors' own work without proper citation, and misappropriation of the work are all unacceptable practices. Any cases of ethical misconduct are treated very seriously and will be dealt with in accordance with the COPE guidelines.

Plagiarism

Manuscripts submitted to *Zoological Journal* may be screened with iThenticate anti-plagiarism software in an attempt to detect and prevent plagiarism. Any manuscript may be screened, especially if there is reason to suppose part or all of the text has been previously published. Prior to final acceptance any manuscript that has not already been screened may be put through iThenticate. More information about iThenticate.

Third-party copyright

In order to reproduce any third party material, including tables, figures, or images, in an article authors must obtain permission from the copyright holder and be compliant with any requirements the copyright holder may have pertaining to this reuse. When seeking to reproduce any kind of third party material authors should request the following:

non-exclusive rights to reproduce the material in the specified article and journal;
print and electronic rights, preferably for use in any form or medium;
the right to use the material for the life of the work; and
world-wide English-language rights.

We are not able to accept permissions which carry a time limit because we retain journal articles as part of our online journal archive.

Third-party content in Open Access papers

If you will be publishing your paper under an Open Access licence but it contains material for which you do not have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

Title of content. Author, Original publication, year of original publication, by permission of [rights holder].

This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.

Further guidelines on clearing permissions.

Conflict of interest

Oxford University Press requires declaration of any conflict of interest upon submission online. If the manuscript is published, conflict of interest information will be communicated in a statement in the published paper.

Permissions regarding reuse of OUP material

Self-archiving policy

Licensing

Open Access

Zoological Journal offers the option of publishing under either a standard licence or an open access licence. Please note that some funders require open access publication as a condition of funding. If you are unsure whether you are required to publish open access, please do clarify any such requirements with your funder or institution.

Should you wish to publish your article open access, you should select your choice of open access licence in our online system after your article has been accepted for publication. You will need to pay an open access charge to publish under an open access licence.

Details of the open access licences and open access charges.

OUP has a growing number of Read and Publish agreements with institutions and consortia which provide funding for open access publishing. This means authors from participating institutions can publish open access, and the institution may pay the charge. Find out if your institution is participating.

Preparation of Manuscript

Manuscript format and structure/style

BASIC FORMATTING GUIDE

Authors should aim to communicate ideas and information clearly and concisely, in language suitable for the moderate specialist. Papers in languages other than English are not accepted unless invited. When a paper has joint authorship, one author must accept responsibility for all correspondence; the full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author who is to check proofs should be provided. Authors preparing long texts (20 000 words or more, including references, etc.) should consult the Editor before considering submission. Please submit your manuscript in an editable format such as .doc, .docx or .rtf, prepared on A4, paginated, double spaced throughout (i.e. including references and quotations), with ample margins. If you submit your manuscript in a non-editable format such as PDF, this will slow the progress of your paper as we will have to contact you to request an editable copy.

Papers should conform to the following general layout:

Article types

Original Article

Review

Invited Review

Title page

This should be uploaded as a separate file, designation 'Title Page'. It should include title, authors, institutions and a short running title. The title should be concise but informative, preferably shorter than 25 words. Catchy titles are encouraged. Where appropriate the title should include mention of family or higher taxon in the form: 'The Evolution of the Brown Rat, *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae)'. A subtitle may be included. Papers in numbered series are not accepted. Names of new taxa should not be given in titles.

Abstract

Abstracts must be on a separate page and must be concise, clearly written and cover the context of the paper. The abstract is of great importance as it may be reproduced elsewhere and is all that many may see of your work. It should be about 100–200 words long and should summarize the paper in a form that is intelligible in conjunction with the title. It is advisable to avoid descriptions, lists or jargon if possible. It should not include references. The abstract should be followed by up to ten keywords additional to those in the title (alphabetically arranged and separated by hyphens) identifying the subject matter for retrieval systems. Taxonomic authorities should not be included in the abstract.

Subject matter

The paper should be divided into main sections: INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION and CONCLUSION, with the hierarchy of headings below these not exceeding two, except in systematic hierarchies. Results are presented in present tense, whereas previous studies that are discussed need to be presented in past tense. Do not merge results and discussions. Please present your work in clear and concise language, keeping the broad readership in mind. Separate Results and Discussion sections provide a clear distinction between results of the study at hand and discussion of results of other studies, so these separate sections generally should be used.

The Zoological Codes must be strictly followed. Names of genera and species should be printed in italic or underlined to indicate italic; do not underline suprageneric taxon names. Cite the author of species on first mention. When new taxonomic names are published, these are marked in bold, followed by the author name and sp. nov., gen. nov. or another abbreviation of the appropriate taxonomic level described on the first mention in the text. Authors can choose any name that is appropriate, but

when based on Latin or Latinised Greek the names should be correctly formed. Etymology of the name needs to be provided.

Voucher specimens used for the study need to be clearly stated by collector, number and the collection where the specimen is housed.

Use SI units, and the appropriate symbols (mm, not millimetre; μm , not micron; s, not sec; min for minute; c for circa; Myr for million years, Mya for million years ago; etc.). Use an n-dash (–), not a hyphen (-), for ranges and use the times sign \times (not the letter x) for multiplication, dimensions, crosses and hybrids. Use the negative index (m-1, l-1, h-1) except in cases such as 'per plant'. Avoid elaborate tables of original or derived data, long lists of species, etc.; if such data are absolutely essential, consider including them as appendices or as online-only supplementary material. Avoid footnotes and keep cross references by page to an absolute minimum. Please provide a full English translation [in square brackets] for any quoted matter that is not in English.

References

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

Search for EndNote reference styles.

Search for Reference Manager reference styles.

(i) In the text, give references in the following forms: 'Stork (1988) said', 'Stork (1988: 331)' where it is desired to refer to a specific page, and '(Rapport, 1983)' where giving reference simply as authority for a statement. Note that names of joint authors are connected by '&' in the text. For papers by three or more authors, use et al. throughout.

(ii) The list of references must include all publications cited in the text and only these. Prior to submission, make certain that all references in the text agree with those in the references section, and that spelling is consistent throughout. In the list of references, titles of periodicals must be given in full, not abbreviated. For books, give the title, place of publication, name of publisher (if after 1930), and indication of edition if not the first. In papers with half-tones, plate or figure citations are required only if they fall outside the pagination of the reference cited. References should conform as exactly as possible to one of these four styles, according to the type of publication cited.

Kamiński MJ, Kanda K, Lumen R, Smith AD, Iwan D. 2019. Molecular phylogeny of Pedinini (Coleoptera, Tenebrionidae) and its implications for higher-level classification, *Zoological Journal of the Linnean Society* 185: 77–97.

Gould SJ. 1989. *Wonderful life: the Burgess Shale and the nature of history*. New York: W.W. Norton.

Dow MM, Cheverud JM, Rhoads J, Friedlaender J. 1987b. Statistical comparison of biological and cultural/history variation. In: Friedlaender J, Howells WW, Rhoads J, eds. *Solomon Islands project: health, human biology, and cultural change*. New York: Oxford University Press, 265-281.

Gay HJ. 1990. The ant association and structural rhizome modifications of the far eastern fern genus *Lecanopteris* (Polypodiaceae). Unpublished D. Phil. Thesis, Oxford University.

(iii) Other citations such as papers 'in press' may appear on the list but not papers 'submitted', 'in review' or 'in preparation'. These may be cited in the text as 'unpubl. data'. A personal communication may be cited in the text but not in the reference list. Please give the initials and surnames for all authors of personal communications and unpublished data.

(iv) In the case of taxonomic reviews, authors are requested to include full references for taxonomic authorities.

(v) Give foreign language references in Roman alphabet (but include accents in languages that use special letters and accents, like in French, German, Spanish, Swedish, Danish, Czech, etc.). If necessary, transliterate in accordance with a recognized scheme (e.g. pinyin). For the Cyrillic alphabet use British Standard BS 2979 (1958). If only a published translation has been consulted, cite the translation, not the original. Add translations not supplied by the author of the reference in square brackets.

Tables

Keep these as simple as possible, with few horizontal and, preferably, no vertical rules. When assembling complex tables and data matrices, bear the dimensions of the printed page (225 × 168 mm) in mind; reducing typesize to accommodate a multiplicity of columns will affect legibility.

Illustrations

These normally include (1) half-tones reproduced from photographs, (2) black and white figures reproduced from drawings and (3) diagrams. Use one consecutive set of Arabic numbers for all illustrations (do not separate 'Plates' and 'Text-figures' - treat all as 'Figures'). Figures should be numbered in the order in which they are cited in the text. Use upper case letters for subdivisions (e.g. Figure 1A-D) of figures; all other lettering should be lower case.

Half-tones reproduced from photographs: increasingly, authors' original images are captured digitally rather than by conventional film photography. In these cases, please use settings on your equipment for the highest possible image quality (minimum 300dpi). Desktop technology now allows authors to prepare plates by scanning photographic originals and then labelling them using graphics programs such as Adobe Illustrator. These are acceptable provided:

Resolution is a minimum of 300 dpi at the final required image size. The labelling and any line drawings in a composite figure should be added in vector format. If any labelling or line drawings are embedded in the file then the resolution must be a minimum of 800 dpi. Please note that vector format labelling will give the best results for the online version of your paper.

Electronic files are saved uncompressed as TIFF, JPEG, editable PDF, PPT, DOC or EPS files.

In the case that it is not possible to provide electronic versions, please supply photographic prints with labelling applied to a transparent overlay or to a photocopy.

Grouping and mounting: when grouping photographs, aim to make the dimensions of the group (including guttering of 2 mm between each picture) as close as possible to the page dimensions of 168 × 225 mm, thereby optimizing use of the available space. Remember that grouping photographs of varied contrast can result in poor reproduction. If supplied as photographic prints, the group should be mounted on thin card. Take care to keep the surface of the prints clean and free of adhesive. Always

provide overlays to protect the photographs from damage.

Lettering and numbering: If supplied as photographic prints, letters and numbers should be applied in the form of dry-transfer ('Letraset') letters, numbers, arrows and scale bars, but not measurements (values), to transparent overlays in the required positions, rather than to the photographs themselves; this helps to avoid making pressure marks on the delicate surface of the prints, and facilitates relabelling, should this be required. Alternatively, pencilled instructions can be indicated on duplicates or photocopies marked 'FOR LABELLING ONLY'. Self-adhesive labels should be avoided, but if they are used, they should not be attached directly to either photographs or overlays, but to photocopies, to indicate where they are to be positioned. Labelling will be inserted electronically by the typesetter in due course.

Colour: colour is free of charge.

Black and white figures reproduced from drawings: these should be scanned at a minimum resolution of 800 dpi and supplied in TIFF, JPEG, or editable PDF format. Lines must be clean and heavy enough to stand reduction; drawings should be no more than twice page size. The maximum dimensions of published figures are 168 × 225 mm. Scale bars are the most satisfactory way of indicating magnification. Take account of proposed reduction when lettering drawings.

Diagrams: in most instances the author's electronic versions of diagrams are used and may be re-labelled to conform to journal style. These should be supplied as vector format Encapsulated PostScript (EPS) files. Please note that diagrams or graphs will not reproduce well in the online version of your paper unless they are in vector format due to low maximum screen resolution.

Type legends for Figures in numerical order on a separate sheet. Where a 'key' is required for abbreviations used in more than one Figure, this should be included as a section of the main text.

Authors wishing to use illustrations already published must obtain written permission from the copyright holder before submitting the manuscript. Authors may, in the first instance, submit good xerox or photographic copies of figures rather than the originals.

Upon revision papers should again be submitted in an editable file format (i.e. not PDF) and figures must be submitted as separate, high-resolution, uncompressed TIF or EPS files.

Information on Latex files.

You can also send queries about figure files to zoolin_oup@newgen.co.

Supporting Information

Submit all material to be considered as Supporting Information online at the same time as the main manuscript. Ensure that the supporting information is referred to in the main manuscript at an appropriate point in the text. Make sure you include a section at the end of the manuscript (after the references) entitled 'SUPPORTING INFORMATION' and listing the titles of the supplementary files. Supplementary figures and tables should be numbered 'Figure S1', 'Table S1', etc. Supporting information will be available online only and will not be copyedited, so it is essential that it is clearly and succinctly presented, and that the style conforms with the rest of the paper. Also ensure that the presentation will work on any Internet browser. It is not recommended for the files to be more than 2 MB each, although exceptions can be made at the editorial office's discretion.

Proofs

Authors will receive a link to the PDF proof of their manuscript on our online system by email, and it is essential that a current email address is supplied with all manuscripts. Proofing instructions will accompany the PDF file but the proof should be checked immediately upon receipt and uploaded in accordance with covering instructions. Only essential corrections should be made at the proof stage.

Advance Access

For Zoological Journal, manuscripts arrive at OUP and go through the production process until the final versions are ready to publish. These are then published on an Advance Access page and they will remain on the page up until the issue that they are assigned to is published.

Immutable Advance Access

In order to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN) with regard to nomenclatural works, ALL articles, regardless of whether they include nomenclatural information, that are published in Journal XX will be immutable from [insert date]; this means that no changes will be allowed to any article without the publication of an erratum clearly stating the changes that have been made. Therefore, it is the responsibility of the authors to carefully check their proofs for accuracy, and to notify the publisher of any changes that are necessary prior to Advance Access publication.

Nomenclatural Works

You will be asked during the submission process whether your article contains a nomenclatural act. If it does, in order to comply with ICZN regulations, you will need to register your article in ZooBank and provide a Life Science Identifier (LSID) at proof stage, which the editorial team will insert into the article. Following publication, you will need to update your ZooBank entry with the Volume, and Issue information.

Preprint Policy

Authors retain the right to make an Author's Original Version (preprint) available through various channels, and this does not prevent submission to the journal. For further information see our Online Licensing, Copyright and Permissions policies. If accepted, the authors are required to update the status of any preprint, including your published paper's DOI, as described on our Author Self-Archiving policy page.