



Universidade Federal da Grande Dourados  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia e Conservação da Biodiversidade



Viviana de Oliveira Torres

**ASSINATURA QUÍMICA CUTICULAR COMO FERRAMENTA PARA INDICAR  
STATUS REPRODUTIVO E RELAÇÕES ENTRE VESPAS POLISTINAE  
(HYMENOPTERA, VESPIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTORA EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientador: William Fernando Antonialli Junior

Dourados-MS  
Março de 2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil**

T693a Torres, Viviana de Oliveira.  
Assinatura química cuticular como ferramenta para  
indicar status reprodutivo e relações entre vespas  
Polistinae (Hymenoptera: Vespidae) / Viviana de  
Oliveira Torres. – Dourados, MS : UFGD, 2014.  
161 f.

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli  
Junior.

Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da  
Biodiversidade). – Universidade Federal da Grande  
Dourados.

1. Vespas. I. Antonialli Junior, William Fernando. II.  
Título.

CDD: 595.798

Responsável: Vagner Almeida dos Santos. Bibliotecário - CRB.1/2620

“Assinatura química cuticular como ferramenta para indicar status reprodutivo e relações entre vespas Polistinae (Hymenoptera, Vespidae)”

Por

**VIVANA DE OLIVEIRA TORRES**

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
DOUTOR EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE  
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior  
Orientador - UEMS

Prof. Dr. Fábio Prezoto  
Membro titular - UFJF

Prof. Dr. Yzel Rondon Suárez  
Membro titular - UEMS

Prof. Dr. Sandro Márcio Lima  
Membro titular - UEMS

Prof. Dr. Mateus Pepinelli  
Membro titular - UFSC

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2014.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente ao meu grande Deus que sempre me deu forças para lutar por meus ideais e que se fez presente em meu coração nos momentos de alegria e de dificuldades.

Ao meu marido “Célio Luiz da Silva”, um homem maravilhoso que me apoiou e que não mediu esforços para me incentivar nos momentos de dificuldades. Obrigada por acreditar em mim!

À minha princesinha, Maria Eduarda Torres da Silva, que nasceu em 2013 e que por muitas vezes fez a mamãe deixar de lado um pouco o stress para poder dar atenção e brincar com ela.

Aos meus pais (Aparecida e Felintro) e meus irmãos (Daiane e Romario) e toda a minha família que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a continuar meus estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior que aceitou me orientar nesta pesquisa, não medindo esforços para sanar a todas minhas dúvidas, além da paciência e compreensão durante toda a coleta, organização e discussão dos dados.

Ao Prof. Dr. Mateus Pepinelli que se disponibilizou para enviar o material para as análises moleculares e que o fez com a maior paciência, me socorrendo sempre que não conseguia rodar as análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Orlando Tobias Silveira pela disponibilidade de identificação de todas as espécies coletadas para o desenvolvimento desse trabalho e pela contribuição e orientação na discussão taxonômica do grupo estudado.

Ao Prof. Dr. Yzel Rondon Suárez pelo auxílio nos testes estatísticos, pelas sugestões e correções que foram de extrema importância para a qualidade da tese.

À amiga Denise S. Antonio, que me socorreu nos momentos fáceis e difíceis da tese, que sempre estava pronta para me dar uma carona ou mesmo para quem precisasse. Que foi amiga de fofoca, de coleta, de artigo, de tereré e babá, cuidando inúmeras vezes da minha princesinha com muita dedicação e paciência quando a mamãe precisava sentar em frente ao computador e escrever.

Aos demais amigos de laboratório: Eva, Ellen, Angélica, Dayana, Erika, Kamylla, Maria da Graça, Juliana, Mychelle, Luiz/Junior, Thiago, Luan, Márton, Ingrid e Romario que direta ou indiretamente me ajudaram a superar mais uma grande etapa da minha vida.

A todos que direta ou indiretamente participaram ou me auxiliaram na elaboração desta tese. MUITO OBRIGADA!

Dedico esta tese ao meu marido Célio Luiz da Silva pela enorme paciência e compreensão que teve para comigo nestes últimos 4 anos.

## Sumário

	Pág.
<b>Abstract</b> .....	1
<b>Resumo</b> .....	2
<b>Introdução geral</b> .....	5
<b>Artigo 1:</b> Uso de Sequências do Gene COI e Perfil Químico da Cutícula para Inferir Relações entre Espécies de Vespas (Hymenoptera: Polistinae).....	30
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	43
<b>Artigo 2:</b> Perfil Químico de Ninhos de Vespas Polistinae como Ferramenta para Distinção Intra e Interespecífica .....	65
Introdução.....	68
Material e Métodos.....	71
Resultados.....	76
Discussão.....	77
<b>Artigo 3:</b> Status Reprodutivo das Fêmeas na Vespa Eussocial <i>Polistes ferreri</i> (Hymenoptera: Vespidae).....	98
Introdução.....	101
Material e Métodos.....	104
Resultados.....	106
Discussão.....	107
<b>Artigo 4:</b> Status Reprodutivo da Vespa Social <i>Polistes versicolor</i> (Hymenoptera, Vespidae).....	130
Introdução.....	133
Material e Métodos.....	135
Resultados e Discussão.....	137
Considerações finais.....	156
ANEXO: Normas da Revista Sociobiology.....	158

OBS: Todos os capítulos estão formatados de acordo com as normas da Revista Sociobiology.



### **Cuticular Chemistry Signature as Tool to Indicate Status Reproductive and Relationships Among Polistinae Wasps (Hymenoptera, Vespidae)**

**Abstract.** The Polistinae family calls the attention of several researchers since it is constituted by social wasp species which may help in understanding the eusocial behavior evolution. Because of this, many studies about basic biology, behavior, systematics and phylogenetic relationships have been performed. Nowadays it is worth being highlighted studies involving molecular sequences and cuticular hydrocarbon profile in order to establish intra-and interspecific relationships. Therefore, the aim of this study was to evaluate the joined use of sequences from cytochrome C oxidase I gene and chemical compounds from the cuticle and the nests to infer relationships among Polistinae wasps species. We also assessed the use of these compounds from the cuticle to indicate the females hierarchical position and therefore, mediate the interactions among them in their colonies. The results of the genetic distance neighbor-joining tree generated from COI gene sequences have grouped Epiponini, Polistini and Mischocyttarini congruently with the phylogenetic relationships currently proposed, even for subgenera and species. The cuticle chemical profile only pointed closer relationship with the current phylogeny and also with the genetic matrix when species with larger colonies collected in different environments were assessed. The chemical composition of adult cuticle and the nest substrate can be used for analyzes of intra and interspecific relationships; the chemical elements that compose the nest substrate is also part of the chemical composition of the adult cuticle; moreover, nest and adult substrate chemical profile variation varies according to the type of environment in which the

colonies nest. In both colonies *Polistes versicolor* and *Polistes ferreri*, 3 female categories could be identified by their cuticle chemical composes which are related to different physiological conditions of its ovaries although as in most species of this group, there is no significant morphological differences among them. Therefore, the results of this work demonstrate that the cuticle chemical compounds can be used to infer intra and interspecific relationships among social wasp species, especially when supplementing with molecular techniques. The nests chemical composition is directly related to adults and it may vary according to the environment and therefore it can be used to assess differences among populations. Finally, as it has already been reported in other studies, even though no morphological differences among females of wasps colonies of the genus *Polistes*, they probably recognize their reproductive status, and therefore, their hierarchical position in the colonies, also by these cuticular compounds.

**Key words.** Ovarian development, gene COI, cuticular hydrocarbons, nests, social wasp.

### **Assinatura Química Cuticular como Ferramenta para Indicar Status Reprodutivo e Relações entre Vespas Polistinae (Hymenoptera, Vespidae)**

**Resumo.** A família Polistinae desperta o interesse de muitos pesquisadores, uma vez que é constituída por espécies de vespas sociais que podem auxiliar no entendimento da evolução do comportamento eussocial. Por conta disto, diversos estudos sobre a biologia básica, comportamento, sistemática e relações filogenéticas já foram realizados. Atualmente, merecem destaque os trabalhos realizados com sequências moleculares e com o perfil de hidrocarbonetos cuticulares para estabelecer relações intra e interespecíficas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso conjunto de sequências do gene citocromo C oxidase I e dos compostos químicos da cutícula e de ninhos para inferir relações entre espécies de vespas Polistinae. Também foi avaliado uso destes compostos da cutícula para indicar a posição hierárquica de fêmeas e, portanto, mediar às interações entre elas em suas colônias. Os resultados da árvore de distância genética neighbor-joining gerada a partir das sequências do gene COI agrupou Epiponini, Polistini e Mischocyttarini de forma congruente com as relações filogenéticas propostas atualmente, mesmo em relação aos subgêneros e espécies. Já o perfil químico da cutícula só apontou relação mais próxima da filogenia atual e também com a matriz genética quando foram avaliadas as espécies com maior número de colônias coletadas em diferentes ambientes. A composição química da cutícula do adulto e do substrato do ninho podem ser usados para análises de relações intra e interespecíficas e os elementos químicos que compõem o substrato do ninho também fazem parte da composição química cuticular do adulto, além disso, variação do perfil químico do substrato do ninho e do adulto varia de acordo com o tipo de ambiente em

que as colônias nidificam. Tanto em colônias de *Polistes versicolor* quanto de *Polistes ferreri* 3 categorias de fêmeas podem ser identificadas por meio dos compostos químicos de sua cutícula, as quais estão relacionadas às diferentes condições fisiológicas de seus ovários, embora, como na maioria das espécies desta grupo, não haja diferenças morfológicas significativas entre elas. Portanto, os resultados deste trabalho demonstram que os compostos químicos da cutícula podem ser usados para inferir relações intra e interespecíficas entre espécies de vespas sociais, sobretudo quando em complemento com técnicas moleculares. A composição química dos ninhos está diretamente relacionada à dos adultos e pode variar, de acordo com o ambiente e, portanto, pode ser usada para avaliar diferenças entre populações. Por fim, como já relatado em outros trabalhos, mesmo não havendo diferenças morfológicas entre fêmeas de colônias de vespas do gênero *Polistes*, elas provavelmente reconhecem seu status reprodutivo e, portanto, sua posição hierárquica nas colônias, também por meio destes compostos cuticulares.

**Palavras chave.** Desenvolvimento ovariano, gene COI, hidrocarbonetos cuticulares, ninhos, vespas sociais.

## **Introdução geral**

### *Relações filogenéticas em vespas sociais*

A família Vespidae é constituída atualmente por seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, cujo comportamento varia desde espécies solitárias até eussociais (Carpenter & Marques, 2001). Entretanto, o comportamento social está presente apenas em Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae. Polistinae é uma subfamília que possui distribuição cosmopolita, contudo, sua maior diversidade está concentrada na região Neotropical, sendo que no Brasil sua fauna é composta por 22 gêneros e 304 espécies (Carpenter & Marques, 2001). Logo, a ampla distribuição geográfica e a variedade de características comportamentais de Polistinae a torna interessante para estudos sobre diversos aspectos evolutivos.

Contudo, as relações filogenéticas entre espécies, subgêneros e gêneros não estão completamente resolvidas. Neste aspecto, o trabalho pioneiro e mais completo sobre a taxonomia de Polistinae foi realizado por Richards (1978) que elaborou uma chave descritiva de mais de 600 espécies com chaves para gêneros, subgêneros e espécies por meio de características morfológicas, além disso, Richards também descreveu aspectos da biologia desse grupo.

Após décadas, vários outros trabalhos já foram realizados para melhorar a compreensão das relações evolutivas entre as espécies, subgêneros, gêneros e subfamílias de vespas sociais (Carpenter, 1991, 2003; Schmitz & Moritz, 1998; Zhu et al., 2000; Arévalo et al. 2004; Hines et al., 2007; Pickett & Carpenter 2010). Para a família Vespidae os trabalhos mais importantes foram os de Carpenter (1991, 2003) e de Pickett & Carpenter (2010), os quais levam em consideração aspectos morfológicos, comportamentais e o mais recente inclui dados moleculares de várias espécies. Nestes

trabalhos os autores sempre chegam à mesma conclusão, de que o comportamento eussocial surgiu apenas uma vez durante a história evolutiva das vespas.

Contudo, há outros trabalhos como os de Schmitz & Moritz (1998) e Hines et al. (2007) que discutem uma origem difilética para a eussocialidade que teria ocorrido uma vez em Stenogastrinae e outra nas subfamílias Polistinae e Vespinae. Entretanto, vale ressaltar que apesar de Hines et al. (2007) utilizar uma base de dados provenientes de fragmentos de quatro genes nucleares e representantes das seis subfamílias, utilizaram apenas 27 espécies dentre as mais de cinco mil descritas. Além disso, inúmeros equívocos cometidos por esses autores são destacados no trabalho de Pickett & Carpenter (2010).

Para a subfamília Polistinae especificamente pode-se destacar o trabalho de Zhu et al. (2000) que analisaram a evolução de sequências em regiões loci de microssatélites em 58 espécies de Polistinae. Além disso, o trabalho de Arévalo et al. (2004) investigou a filogenia desta subfamília por meio de caracteres morfológicos, comportamentais e moleculares utilizando 69 espécies, com espécimes de diferentes continentes. O trabalho de Arévalo et al. (2004) investigou a monofilia no gênero *Polistes* e avaliou as relações filogenéticas entre as tribos Epiponini, Ropalidiini e Mischocyttarini.

Nas relações filogenéticas entre espécies destacam-se os trabalhos de Carpenter et al. (1993), Choudhary et al. (1994), Carpenter (1996), Carpenter (1997), Pickett & Wenzel (2004) e Pickett et al. (2006) que investigaram as relações entre as espécies do gênero *Polistes*. Estes trabalhos variam desde estudos entre espécies sociais parasitas inquilinas e espécies hospedeiras até dados morfológicos, comportamentais e de sequências moleculares. Para o gênero *Mischocyttarus* merecem destaque os trabalhos de Silveira (2006, 2008) e O'Connor et al. (2011) e do gênero *Polybia* merece destaque o de Carpenter et al. (2000).

Para avaliar as relações entre táxons uma ferramenta confiável e atual é o uso de sequenciamento de DNA, cuja técnica pode fornecer parâmetros para inferir relações filogenéticas entre ou dentro de grupos (Brown, 1983; Arévalo et al., 2004; Hines et al., 2007; Pickett & Carpenter, 2010).

De fato, apesar das características morfológicas serem as pioneiras nos princípios cladísticos (Henning, 1965; Hillis & Wiens, 2000; Zhu et al., 2000) trabalhos usando sequências moleculares tem contribuído para resolução de muitas relações filogenéticas (Brown, 1983; Cameron & Mardulyn, 1993; Moore, 1995; Hillis et al., 1996; Arévalo et al., 2004; Pickett & Carpenter, 2010).

Para análises por meio de sequências moleculares destacam-se os dados obtidos de genes mitocondriais, dentre eles, o gene COI (citocromo C oxidase subunidade I) que foi utilizado por Stahls & Nyblom (2000), Arévalo et al. (2004) e Bajpai & Tewari (2010) para inferir relações análises filogenéticas entre espécies de dípteras e vespas. Contudo, a maioria dos trabalhos tem utilizado mais de um gene ou mais de uma técnica. Dessa forma, não é um conjunto de dados em particular que é melhor para estimar filogenia, mas um conjunto de caracteres, em combinação com diferentes metodologias e técnicas (Moore, 1995; Hillis & Wiens, 2000; Wiens & Slingluff, 2001; Kather & Martin, 2012).

#### *Aspectos comportamentais de vespas sociais Polistinae*

Dentre as características comportamentais da subfamília Polistinae merecem destaque os modos de fundação das colônias. Vespas Polistinae podem fundar suas colônias de duas maneiras. A primeira é a fundação independente, na qual as fêmeas constroem ninhos simples e sem envelope protetor, fundadas por uma ou poucas fêmeas, representadas pelos gêneros *Polistes*, *Mischocyttarus*, *Belonogaster*, *Parapolybia* e

algumas espécies de *Ropalidia* (Jeanne, 1980; Gadagkar, 1991; Jeanne, 1991). Ou ainda, há espécies com fundação por enxameagem, nas quais dezenas de rainhas são acompanhadas por centenas de operárias, as colônias são numerosas e os ninhos geralmente constituídos por envelope protetor, representados pelos 20 gêneros da tribo Epiponini, pelo gênero *Polybioides* e alguns *Ropalidia* (Jeanne, 1980; Jeanne, 1991).

Outro aspecto importante da evolução do comportamento social em vespas é o mecanismo de determinação de castas (rainha e operária), uma vez que pode ocorrer tanto de forma pré-imaginal quanto pós-imaginal.

Na determinação de castas pós-imaginal, a casta é ao menos em parte determinada durante a fase de adulto e as operárias não perdem sua capacidade de reprodução (Gadagkar, 1991). Neste grupo encaixam-se a maioria das espécies de fundação independente, cuja determinação pode ser resultado de uma distinta vantagem trófica para a fêmea dominante, que sendo a mais agressiva ingere mais alimento durante as trocas trofaláticas com operárias (Jeanne, 1972; Röseler, 1991; Spradbery, 1991). Esta vantagem trófica favorece uma maior capacidade reprodutiva para rainhas, permitindo o desenvolvimento de seus ovários (Queller & Strassmann, 1989) e determinando sua maior dominância sobre suas companheiras de ninho (Röseler, 1991).

Por outro lado, na determinação de castas pré-imaginal a nutrição larval e conseqüentemente a taxa de desenvolvimento dos imaturos é afetada (Hunt, 1991; O'Donnell, 1998) dando origem a duas castas distintas. Este tipo de determinação ocorre mais evidentemente em espécies enxameantes como Epiponini e alguns Ropalidini (Jeanne, 1991; Hunt et al., 2001), mas vários trabalhos tem demonstrado que mesmo espécies de fundação independente podem apresentar determinação de castas, ao menos em parte, de forma pré-imaginal (Gadagkar et al., 1991; Keeping, 2002; Tibbetts, 2006; Hunt et al., 2010; Dapporto et al., 2011; Suryanarayanan et al., 2011).

De uma forma ou de outra, rainhas evitam realizar atividades de alto custo energético e risco, tais como forrageamento, as quais são desempenhadas com maior frequência pelas operárias (Strassmann et al., 1984; O'Donnell, 1998). Além disso, a manutenção da colônia e alimentação de adultos e imaturos são comportamentos mais frequentes em operárias (Pratte & Jeanne, 1984). Logo, o repertório comportamental da rainha é menor quando comparado ao das operárias (Pardi, 1948; Jeanne, 1972; Giannotti, 1999; Zara & Balestieri, 2000; Torres et al., 2009; Torres et al., 2012).

#### *Hidrocarbonetos cuticulares*

Para manter a coesão nesse sistema de colônias os insetos sociais desenvolveram mecanismos de comunicação química específicos, sendo os receptores olfativos extremamente importantes nesse processo (Ferreira-Caliman et al., 2007). Dentre os compostos envolvidos estão os denominados semioquímicos ou ainda chamados de feromônios que atuam como gatilhos no indivíduo receptor, provocando reações comportamentais ou fisiológicas específicas (Leal, 2005).

Entre os insetos, inúmeros tipos de feromônios mediam diferentes interações comportamentais: atração de indivíduos do sexo oposto para acasalamento, denominados de feromônios sexuais; agregação de indivíduos para um local específico para alimentação e/ou de acasalamento, através de feromônios de agregação; demarcação de espaço ou formação de trilhas, comportamento comum em formigas, através de feromônios classificados como de marcação ou trilha (Jurenka, 2004). Além destes já citados, os insetos sociais utilizam uma variedade de feromônios para organizar suas atividades na colônia (Jurenka, 2004).

Estes feromônios geralmente são divididos em dois tipos: substâncias leves e voláteis secretadas por glândulas e cadeias de hidrocarbonetos encontradas na cutícula

(Howard, 1993). Os hidrocarbonos cuticulares (HCs) estão agrupados numa classe de compostos pouco voláteis conhecidos como “feromônios de superfície”, os quais aparecem absorvidos pela superfície do corpo e são percebidos por outros insetos, por meio de distâncias pequenas ou detectados por contato direto (Abdalla et al., 2003).

Estes HCs são parte constituinte da camada lipídica que recobre a cutícula dos insetos, de extrema importância para sua sobrevivência, pois têm como função primária evitar dessecação dos indivíduos (Lockey, 1988), além de criar uma barreira contra microorganismos (Provost et al., 2008). Além disso, atualmente sabe-se que os HCs atuam como feromônios de contato, permitindo a identificação de co-específicos, auxiliando na manutenção da estrutura das colônias, separando os indivíduos de acordo com sua função, seu status fisiológico e seu ranque hierárquico (Provost et al., 2008), atuando como uma assinatura química específica do indivíduo.

Os HCs são compostos formados basicamente de hidrogênio e carbono e dentre as centenas já identificados nos insetos existem três grandes classes: os *n*-alcanos, os compostos com ramificações metil e os hidrocarbonetos insaturados (Blomquist, 2010).

Estes HCs são formados tanto por componentes genéticos (Ratnieks, 1991; Page et al., 1991; Arnold et al., 1996; Bagnères & Blomquist, 2010; Kather & Martin, 2012) quanto por ambientais (Ratnieks, 1991; Gamboa, 1996; Bagnères & Blomquist 2010). Dentre os componentes ambientais destaca-se a dieta (Le Moli et al., 1992; Liang & Silverman, 2000; Buczkowski et al., 2005; Sovari et al., 2008), uma vez que estes estudos comprovam que hidrocarbonetos presentes nos itens alimentares podem ser encontrados na cutícula do adulto.

Diversos são os estudos que demonstram a importância desses HCs no papel de reconhecimento de indivíduos de uma população (Dapporto et al., 2004a), de colônias (Layton et al., 1994; Antonialli-Junior et al., 2007; Tannure-Nascimento et al., 2007),

sexo (Cotoneschi et al., 2009), status reprodutivo (Sledge et al., 2001), fertilidade (Monnin, 2006; Izzo et al., 2010) e idade (Neves et al., 2012), além de destacar o papel da composição química da cutícula no estabelecimento e manutenção da hierarquia da colônia (Dapporto et al., 2005; Cotoneschi et al., 2009).

A manutenção de um monopólio reprodutivo pela rainha é um dos marcos atingido pelos insetos sociais e em espécies eussociais menos derivadas acreditava-se que a rainha mantinha seus status reprodutivo usando agressividade para com as demais fêmeas, contudo, nas últimas décadas diversos estudos vêm demonstrando a importância e o papel dos HCs na comunicação entre membros das colônias e na identificação por parte de outros membros da colônia do status da rainha (Bonavita-Cougourdan et al., 1991; Peeters et al., 1999; Liebig et al., 2000; Sledge et al., 2001; Dapporto et al., 2005).

De acordo com Monnin (2006) existe forte relação entre o status reprodutivo e o perfil de HCs nos insetos sociais, sendo essa diferenciação importante para o estabelecimento de uma hierarquia. Em colônias de *Polistes dominula* (Christ) Dapporto et al. (2005), por exemplo, comprovou que a rainha possui um perfil químico cuticular diferente das demais fêmeas e que numa colônia órfã a fêmea que ocupar a posição de rainha adquire um perfil de HCs semelhante ao dela. Além disso, Mitra et al. (2011) observaram que a agressividade de uma fêmea de uma posição hierárquica alta em colônias de *Ropalidia marginata* (Lepeletier) aumenta com a remoção da rainha original, mas diminui quando é feita aplicação de macerado de HCs da glândula de Dufour da rainha original ou mesmo de uma rainha de outra colônia ao substrato do ninho.

Lorenzi et al. (2004) descrevem que a concentração de HCs em *P. dominula* aumenta após a emergência do adulto, principalmente a de alcanos ramificados e os

insaturados. Logo, os indivíduos emergem com um perfil de HCs incompleto (Panek et al., 2001) e, parte destes compostos, podem ser adquiridos após a emergência do adulto por meio de interações sociais (Pfenning et al., 1983; Gamboa et al., 1986; Panek et al., 2000; Lorenzi et al., 2004; Neves et al., 2012), dessa forma, indivíduos podem ser aceitos em outras colônias quando transferidos ainda jovens (Litte, 1976, em vespas; Morel et al., 1988, em formigas; Breed et al., 1988, em abelhas).

Outro fator que tem se mostrado relevante como sinais de reconhecimento em insetos sociais é o odor do próprio material do ninho, bem documentado por Espelie et al. (1990) que descreveram compostos ricos em hidrocarbonetos capazes de serem transferidos entre indivíduos e utilizados como uma forma de assinatura para reconhecimento da colônia. Estudos realizados por Espelie & Hermann (1990) e Espelie et al. (1990) comprovaram a similaridade dos HCs presentes no ninho e no pedicelo do ninho com os perfis químicos da cutícula de adultos e imaturos de *Polistes annularis* (Linnaeus) e *Polistes metricus* (Say), respectivamente.

Sumana et al. (2005) demonstraram a importância que os HCs do ninho de *P. dominula* possuem para a discriminação do sítio natal dessas fêmeas quando retornam de um período de hibernação (diapausa), fenômeno conhecido como filopatria. A discriminação destes locais está associada à similaridade dos compostos químicos dos ninhos com as fundadoras da colônia. Além disso, destaca-se a importância de verificação das condições do local pelas fundadoras antes de tomar a decisão de nidificar ou não.

Outra importância dos HCs que vêm se destacando é o seu uso como ferramenta taxonômica. De acordo com Bagnères & Wicker-Thomas (2010) os HCs tem sido amplamente estudados como caracteres quimiotaxonômicos desde a década de 70, mas perderam um pouco de força com o aparecimento das técnicas moleculares, contudo,

devido à importância dos insetos o interesse nesses hidrocarbonetos tem se mantido. Dentre os trabalhos que propõem o uso destes compostos para este fim, estão dos de Kaib et al. (1991) com térmitas, Martin et al. (2008) com formigas e Baracchi et al. (2010) com vespas Stenogastrinae. Kaib et al. (1991) estudaram o perfil de HCs de seis espécies de *Odontotermes* coletadas de 22 colônias e os autores concluíram que as diferenças intraespecíficas podem ser facilmente desprezadas quando se compara com as diferenças interespecíficas.

Um trabalho realizado por Martin et al (2008) comparou os perfis de HCs entre dezoito espécies de formigas do gênero *Formica* da Finlândia e das Ilhas Britânicas e avaliaram a evolução desse perfil para o gênero. Estes autores chegaram à conclusão de que houve grande estabilidade nos perfis de HCs mesmo quando considerado os fatores ecológicos e que, dessa forma, alguns hidrocarbonetos podem ser espécie-específicos e, portanto, podem ser utilizados para estudos taxonômicos e evolutivos do grupo. Em vespas Stenogastrinae, Baracchi et al. (2010) investigaram as diferenças entre compostos polares presentes na epicutícula das fêmeas e que essa diferença pode ser utilizada para diagnosticar a espécie, uma vez que os caracteres químicos são consistentes com os caracteres físicos. Portanto, os hidrocarbonetos podem ser utilizados tanto como ferramenta biogeográfica para distinguir diferentes populações (Dapporto et al., 2004b) quanto para diferenciar espécies (Martin & Drijfhout, 2009).

A técnica mais utilizada atualmente para análise da composição de HCs em insetos é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (Dietermann et al., 1992) que é confiável e capaz de fornecer boas análises quantitativas, contudo, requer diversas etapas para a preparação das amostras e dependendo da amostra pode haver significativa demora para obtenção de resultados.

Contudo, recentemente tem se estudado a utilização da técnica de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS, “Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy”). A espectroscopia fotoacústica (“Photoacoustic Spectroscopy”), como é geralmente denominada é uma técnica que estuda a interação da radiação com a matéria através de um fenômeno conhecido como efeito fotoacústico, o qual consiste na geração de sinais acústicos por meio da incidência de radiação modulada na superfície da amostra (Skoog et al., 2002).

A leitura é realizada na região espectral do infravermelho médio, que compreende a faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (Skoog et al., 2002; Silverstein et al., 2000), área que abrange a região conhecida como impressão digital (1500–400  $\text{cm}^{-1}$ ). Esta região é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares e, sendo assim, é capaz de identificar e distinguir radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas em determinada amostra (Smith, 1999).

As posições dos átomos que compõe uma molécula não são fixas e podem variar de acordo com vibrações que ocorrem na molécula (Skoog et al., 2002), podendo ser de estiramento ou de deformações angulares. Nas vibrações de estiramento a variação periódica da distância interatômica leva a um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação, no qual as vibrações podem ser simétricas ou assimétricas (Smith, 1999, Skoog et al., 2002, Barbosa, 2007, Andrade et al., 2008). Enquanto que as deformações angulares caracterizam-se pela variação ritmada do ângulo entre duas ligações, sem que a posição relativa dos átomos se altere.

Esta técnica é considerada universal, uma vez que pode ser empregada em vários materiais como, sólidos, líquidos, gases, pó e polímeros. E, dentre as vantagens de utilização dessa técnica estão: aplicação em materiais de grande fragilidade como

materiais biológicos, podendo ser empregada em medidas de amostras com dimensões reduzidas e devido à intensidade da radiação ser baixa não há destruição da amostra (Greene et al., 1992). Além disso, o aparelho utilizado, espectrofotômetro com transformada de Fourier não emprega métodos ópticos dispersivos em sua varredura espectral, assim a obtenção dos espectros pode ser realizada em poucos minutos, dessa forma, um grande número de amostras podem ser analisadas em pouco tempo (Greene et al., 1992).

Para estudos com sistemas biológicos, esta técnica foi utilizada com sucesso para a detecção do fungo *Aspergillus flavus* (Gordon et al., 1997) que ataca o milho; na diferenciação de microorganismos constituintes da superfície da maçã (Irudayaraj et al., 2002); na distinção entre variedades convencionais e transgênicas de soja (Caires et al., 2008); e também para a detecção da ferrugem asiática em folhas de soja infectadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizib* (Sidow) (Andrade et al., 2008).

Com himenópteros sócias esta técnica já foi utilizada para investigar diferenças entre castas e sexo (Antoniali-Junior et al., 2007) , variação intra e interespecífica (Antoniali-Junior et al., 2008) em formigas, composição do perfil de hidrocarbonetos ao longo da idade (Neves et al., 2012) ou, ainda para investigar o efeito do parasitismo social sobre a composição da cutícula entre duas espécies do gênero *Mischocyttarus* (Neves et al., 2013). Além disso, com o trabalho de Ferreira et al. (2012) comprovou-se a confiabilidade desta técnica, uma vez que os resultados obtidos por cromatografia gasosa foram similares aos encontrados por FTIR-PAS.

## Referências Bibliográficas

Abdalla, F.C., Jones, G.R., Morgan, E.D., Cruz-Landim, C. (2003). Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepageletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genet. Mol. Res.*, 2: 191–199.

Andrade, L.H.C., Freitas, P.G., Mantovani, B.G., Figueiredo, M.S., Lima, R.A., Lima, S.M., Rangel, M.A.S. & Mussury, R.M. (2008). Detection of soybean rust contamination in soy leaves by FTIR photoacoustic spectroscopy. *Eur. Phys. J. Especial Topics.*, 153: 539–541. DOI: 10.1140/epjst/e2008-00503-8

Antonialli-junior, W.F., Lima, S.M., Andrade, L.H.C. & Suárez, Y.R. (2007). Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 6: 492–499.

Antonialli-Junior, W.F., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R. & Lima, S.M. (2008). Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 7(2): 559–566.

Arévalo, E., Zhu, Y., Carpenter, J.M. & Strassmann, J.E. (2004). The phylogeny of the social wasp subfamily Polistinae: evidence from microsatellite flanking sequences, mitochondrial COI sequence, and morphological characters. *Biomed. Cent. Evol. Biol.*, 4: 1471–2148. DOI:10.1186/1471-2148-4-8

Arnold, G., Quenet, B., Cornuet, J.M., Masson, C., Deschepper, B., Estoup, A. & Gasquil, P. (1996). Kin recognition in honeybees. *Nature*, 379: 498.  
DOI:10.1038/379498a0

Bagnères, A.G. & Blomquist, G.J. (2010). Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons. In G.J. Blomquist & A.G. Bagnères,

(Eds.), *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology* (pp. 75–99). Cambridge: Cambridge University Press.

Bagnères, A.G. & Wicker-Thomas, C. (2010). Chemical taxonomy with hydrocarbons. In G.J. Blomquist & A.G. Bagnères, (Eds.), *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology* (pp. 121–162). Cambridge: Cambridge University Press.

Bajpai, N. & Tewari, R.R. (2010). Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus *Sarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). *J. Genet.*, 89(1): 51–54. DOI: 10.1007/s12041-010-0010-5

Baracchi, D., Dapporto, L., Tesseo, S., Hashim, R. & Turillazzi, S. (2010). Medium molecular weight polar substance of the cuticle as tools in the study of the taxonomy, systematics and chemical ecology of tropical hover wasps (Hymenoptera: Stenogastrinae). *J. Zool. Syst. Evol.*, 48(2): 109–114. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2009.00543.x

Blomquist, G.J. (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In G.J. Blomquist & A.G. Bagnères, (Eds.), *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology* (pp. 19–34). Cambridge: Cambridge University Press.

Bonavita-Cougourdan, A., Theraulaz, G., Bagnères, A.G., Roux, M., Pratte, M., Provost, E. & Clément, J.L. (1991). Cuticular hydrocarbons, social organization and ovarian development in a polistine wasp: *Polistes dominulus* Christ. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100: 667–680. DOI: org/10.1016/0305-0491(91)90272-F

Breed, M.D., Stiller, T.M. & Moor, M.J. (1988). The ontogeny of kin discrimination cues in the honey bee, *Apis mellifera*. *Behav. Genet.*, 18: 439–448. DOI: 10.1007/BF01065513

Brown, W.M. (1983). Evolution of Animal Mitochondrial DNA. In Nei, M. & Koehn, R.K. (Eds.), *Evolution of Genes and Proteins* (pp. 62-68). Sunderland: Sinauer.

Buczowski, G. & Silverman, J. (2005). Context-dependent nestmate discrimination and the effect of action thresholds on exogenous cue recognition in the Argentine ant. *Anim. Behav.*, 69: 741–749. DOI:10.1016/j.anbehav.2004.06.027

Caires, A.R.L., Teixeira, M.R.O., Suárez, Y.R., Andrade, L.H.C. & Lima, S.M. (2008). Discrimination of transgenic and conventional soybean seeds by Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 62(9): 1044.

Cameron, S.A. & Mardulyn, P. (1993). Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 8687–8691.

Carpenter, J.M. (1991). Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds.), *The social biology of wasps* (pp. 7–32). Ithaca: Cornell University Press.

Carpenter, J.M. (1993). Biogeographic patterns in the Vespidae (Hymenoptera): Two views of Africa and South America. In P. Goldblatt (Ed.), *Biological relationships between Africa and South America* (pp. 139–155). New Haven: Yale University Press.

Carpenter, J.M. (1996). Phylogeny and biogeography of *Polistes*. In S. Turillazzi & M.J. West-Eberhard (Eds.), *Natural History and Evolution of Paper-Wasps* (pp. 18–57). Oxford: Oxford University Press.

Carpenter, J.M. (1997). A note on the names of paper wasp tribes (Insecta: Hymenoptera: Vespidae). *Nat. Hist. Bull.*, 1: 15–16.

Carpenter, J.M. (2003). On "Molecular phylogeny of Vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps". *Am. Mus. Novit.*, 3389: 1–20.

Carpenter, J.M., Kojima, J. & Wenzel, J.W. (2000). *Polybia*, Paraphyly, and Polistinae Phylogeny. *Am. Mus. Novit.*, 3298:1–24. DOI: 10.1206/0003-0082(2000)298<0001:PPAPP>2.0.CO;2

Carpenter, J.M. & Marques, O.M. (2001). Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta, Hymenoptera, Vespoidae, Vespidae). Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia. Publicações Digitais, Vol. II.

Choudhary, M., Strassmann, E., Queller, D.C., Turillazzi, S. & Cervo, R. (1994). Social parasites in polistine wasps are monophyletic: implications for sympatric speciation. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 257: 31–35.

Cotoneschi, C., Dani, F.R., Cervo, R., Scala, C., Strassmann, J.E., Queller, D.C. & Turillazzi, S. (2009). *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) larvae show different cuticular patterns according to their sex: workers seem not use this chemical information. *Chem. Senses.*, 34: 195–202. DOI: 10.1093/chemse/bjn079

Dapporto, L., Theodora, P., Spacchini, C., Pieraccini, G. & Turillazzi, S. (2004a). Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). *Insect. Soc.*, 51: 279–286. DOI 10.1007/s00040-004-0738-0

Dapporto, L., Palagi, E. & Turillazzi, S. (2004b). Cuticular hydrocarbons of *Polistes dominulus* as a biogeographic tool: a study of populations from the Tuscan archipelago and surrounding areas. *J. Chem. Ecol.*, 30: 2139–2151. Doi:10.1023/B:JOEC.0000048779.47821.38

Dapporto, L., Sledge, F.M. & Turillazzi, S. (2005). Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests (Hymenoptera, Vespidae). *J. Insect Physiol.*, 51(3): 969–973. Doi:10.1016/j.jinsphys.2005.04.011

Dapporto, L., Petrocelli, I. & Turillazzi, S. (2011). Incipient morphological caste in *Polistes gallicus* (Vespidae, Hymenoptera). *Zoomorphology*, 130: 197–201. DOI 10.1007/s00435-011-0130-3

Dietermann, V., Peeters, C., Liebig, J., Thivet, V. & Hölldobler, B. (1992). Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 10341–10346. DOI:10.1073/pnas.1834281100

Espelie, K.E. & Hermann, H.R. (1990). Surface lipids of the social wasp *Polistes annularis* (L.) and its nest and nest pedicel. *J. Chem. Ecol.*, 16(6): 1841–1852.

Espelie, K.E., Wenzel, J.W. & Chang, G. (1990). Surface lipids of social wasp *Polistes metricus* Say and its nest and nest pedicel and their relation to nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.*, 16(7): 2229–2241.

Ferreira, A.C., Cardoso, C.A.L., Neves, E.F., Suárez, Y.R. & Antonialli-Junior, W.F. (2012). Distinct linear hydrocarbon profiles and chemical strategy of facultative parasitism among *Mischocyttarus* wasps. *Genet. Mol. Res.*, 11(4): 4351–4359. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012.September.25.3>

Ferreira-Caliman, M.J., Cabral, G.C.P., Mateus, S., Turatti, I.C.C., Nascimento, F.S. & Zucchi, R. (2007). Composição química da epicutícula de 77 operárias de *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*: 1–2.

Gadagkar, R. (1991). *Belonogaster*, *Mischocyttarus*, *Parapolybia*, and independent founding *Ropalidia*. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds), *The social biology of wasps* (pp. 149–190). Ithaca: Cornell University Press.

Gadagkar, R. & Joshi, N.V. (1983). Quantitative ethology of social wasps: Time-activity budgets and caste differentiation in *Ropalidia marginata* (Lep.) (Hymenoptera: Vespidae). *Anim. Behav.*, 31: 26–31.

Gadagkar, R., Bhagavan, S., Chandrashekara, & Vinutha, C. (1991). The role of larval nutrition in pre-imaginal biasing of caste in the primitively eusocial wasp *Ropalidia marginata* (Hymenoptera: Vespidae). *Ecol. Entomol.*, 16: 435–440.  
DOI:10.1111/j.1365-2311.1991.tb00236.x

Gamboa, G.J. (1996). Kin recognition in social wasps. In S. Turillazzi & M.J. West-Eberhard (Eds.), *Natural history and evolution of paper wasp* (pp. 161–177). Oxford: Oxford University Press.

Gamboa, G.J., Reeve, H.K., Ferguson, I.D. & Wacker, T.L. (1986a). Nestmate recognition in social wasps: origin and acquisition of recognition odours. *Anim. Behav.*, 34: 685–695. DOI:10.1016/S0003-3472(86)80053-7

Giannotti, E. (1999). Organization of the eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera: Vespidae). *Sociobiology*, 33: 325–338.

Gordon, S.H., Schudy, R.B., Wheeler, B.C., Wicklow, D.T., Greene, R.V. (1997). Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of *Aspergillus flavus* infection in corn. *Int. J. Food Microbiol.*, 35: 179–186.

Greene, R.V., Gordon, S.H., Jackson, M.A. & Bennett, G.A. (1992). Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 1144–1149. DOI:10.1021/jf00019a011

Henning, W. (1965). Phylogenetic Systematics. *Annu. Rev. Entomol.*, 10: 97–116.

Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (1996). *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland.

Hillis, D.M. & Wiens, J.J. (2000). Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. In: J.J. Wiens (Ed.), *Phylogenetic Analysis of Morphological Data* (pp. 1-19). Washington: Smithsonian Institution Press.

Hines, H.M., Hunt, J.H., O'Connor, T.K., Gillespie, J.J. & Cameron, S.A. (2007). Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(9): 3295–3299. DOI:10.1073/pnas.0610140104

Howard, R.W. (1993). Cuticular hydrocarbon and chemical communication. In D.W. Stanley-Samuelson & D.R. Nelson (Eds.), *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology* (pp. 179-226). Lincoln: University of Nebraska Press.

Hunt, J.H. (1991). Nourishment and the evolution of the Social Vespidae. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds), *The social biology of wasps* (pp. 426–450). Ithaca: Cornell University Press.

Hunt, J.H., O'Donnell, S., Chernoff, N. & Brownie, C. (2001). Observations on two Neotropical swarn-founding wasps *Agelaia yepocapa* and *Agelaia panamaensis* (Hymenoptera: Vespidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 4: 555-562.

Hunt, J.H., Wolschin, F., Henshaw, M.T., Newman, T.C., Toth, A.L. & Amdam, G.V. (2010). Differential gene expression and protein abundance evince ontogenetic bias toward castes in a primitively eusocial wasp. *PLoS ONE* 5(5): e10674. doi:10.1371/journal.pone.0010674

Irudayaraj, J., Yang, H., Sakhamuri, S. (2002). Differentiation and detection of microorganisms using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 606 (1-3): 181-188.

Izzo, A., Wells, M., Huang, Z. & Tibbetts, E. (2010). Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64: 857–874. DOI 10.1007/s00265-010-0902-7

Jeanne, R.L. (1972). Social biology of the neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. Bull. Mus. Comp. Zool. 144: 63–150.

Jeanne, R.L. (1980). Evolution of social behavior in Vespidae. Annu. Rev. Entomol., 25: 371–395.

Jeanne, R.L. (1991). Polyethism. In K.G. Ross K.G. & R.W. Matthews (Eds), The social biology of wasps (pp. 389–425). Ithaca: Cornell University Press.

Jurenka, R. (2004). Insect pheromone biosynthesis. In S. Schulz (Ed.), The chemistry of pheromones and other semiochemicals (pp. 97–132). Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Kaib, M., Brandl, R., Bagine, R.K.N. (1991). Cuticular hydrocarbons profiles: a valuable tool in termite taxonomy. Naturwissenschaften., 78:176–179.

DOI:10.1007/BF01136208

Kather, R. & Martin, S.J. (2012). Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. Physiol. Entomol., 37: 25–32.

DOI:10.1111/j.1365-3032.2011.00826.x

Layton, J.M., Camann, M.A. & Espelie, K.E. (1994). Cuticular lipids profiles of queens, workers and males of social wasp *Polistes metricus* say are colony-specific. J. Chem. Ecol., 20(9): 2307–2321. DOI: 10.1007/BF02033205

Le Moli, F., Mori, A. & Grasso, D. A. (1992). Nestmate and conspecific non-nestmate recognition in *Formica cunicularia* Latr.: the effect of diet difference. In J. Billen (Ed.), Biology and evolution of social insects (pp. 161–165). Leuven, Belgium: Leuven University Press.

Leal, W.S. (2005). Pheromone reception. Top. Curr. Chem., 240: 1-36.

DOI:10.1007/b98314

Liang, D. & Silverman, J. (2000). 'You are what you eat': diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften.*, 87: 412–416.

Liebig, J., Peeters, C., Oldham, N.J., Markstädter, C. & Hölldobler, B. (2000). Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*?. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97(8): 4124–4131. Doi:10.1073/pnas.97.8.4124.

Litte, M.I. (1976). Self, kin, and social behavior in the polistine wasp *Mischocyttarus mexicanus*. Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, New York, 242p.

Lockey, K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89: 595–645. DOI.org/10.1016/0305-0491(88)90305-7

Lorenzi, M.C., Sledge, M.F., Laiolo, P., Sturlini, E. & Turillazzi, S. (2004). Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. *J. Insect. Physiol.*, 50(10): 935–941. DOI.org/10.1016/j.jinsphys.2004.07.005.

Martin, S.J., Helantera, H. & Drijfhout, F.P. (2008). Evolution of species-specific cuticular hydrocarbon patterns in *Formica* ants. *Biol. J. Linn. Soc.*, 95: 131–140. Doi:10.1111/j.1095-8312.2008.01038.x

Martin, S.J. & Drijfhout, F. (2009). A Review of Ant Cuticular Hydrocarbons. *J. Chem. Ecol.* 35: 1151–1161. DOI 10.1007/s10886-009-9695-

Mitra, A., Saha, P., Elihu, C., Bhadra, A. & Gadagkar, R. (2011). Communication in *Ropalidia marginata*: Dufour's gland contains queen signal that is perceived across colonies and does not contain colony signal. *J. Insect Physiol.*, 57: 280–284. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.11.014

Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann. Zool. Fenn.*, 43: 515–530.

Moore, W.S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49: 718–726.

Morel, L., Vander Meer, R.K. & Lavine, B.K. (1988). Ontogeny of nestmate recognition cues in the red carpenter ant (*Camponotus oridanus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 22: 175–183.

Neves, E.F., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R., Lima, S.M. & Antonialli-Junior, W.F. (2012). Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genet. Mol. Res.*, 11 (3): 1891–1898. DOI: 10.4238/2012

O'Connor, T.K., Starr, C.K. & Cameron, S.A. (2011). The Neotropical social wasp *Mischocyttarus 'alfkenii'* Ducke (Hymenoptera: Vespidae) is a pair of ethospecies. *Syst. Entomol.*, 36: 446–452. DOI 10.1111/j.1365-3113.2011.00575.x

O'Donnell, S. (1998). Dominance and polyethism in the eusocial wasp *Mischocyttarus mastigophorus* (Hymenoptera: Vespidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 43: 327–331. DOI:10.1007/s002650050498

Page, R.E.Jr., Metcalf, R.A., Metcalf, R.L., Erickson, E.H.Jr. & Lampman, R.L. (1991). Extractable hydrocarbons and kin recognition in honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Chem. Ecol.*, 17(4): 745–756. DOI 10.1007/BF00994197

Panek, H.R., Conibear, E., Brayn, J.D., Colvin, R.T., Goshorn, C.D. & Robinson, L.C. (2000). Identification of Rgp1p, a novel Golgi recycling factor, as a protein required for efficient localization of a yeast casein kinase 1 to the plasma membrane. *J. Cell Sci.*, 113: 4545–4555.

Panek, L.M., Gamboa G.J., & Espelie, K.E. (2001). The effect of a wasp's age on its cuticular hydrocarbon profile and its tolerance by nestmate and non-nestmate conspecifics (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). *Ethology*, 107: 55–63.

DOI:10.1046/j.1439-0310.2001.00633.x

Pardi, L. (1948). Dominance order in *Polistes* wasps. *Physiol. Zool.*, 21: 1–13.

Peeters, C., Monnin, T. & Malosse, C. (1999). Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queen less ant. *P. Roy. Soc B.*, 266: 1323–1327.

DOI:10.1098/rspb.1999.0782.

Pfenning, D.W., Gamboa, G.J., Reeve, H.K., Shellman-Reeve, J. & Ferguson, T.D. (1983). The mechanism of nestmate discrimination in social wasp (*Polistes*, Hymenoptera: Vespidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 13: 299–305.

Pickett, K.M. & Wenzel, J.W. (2004). Phylogenetic analysis of the New World *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae) using morphology and molecules. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 77 (4): 742–760.

Pickett, K.M., Carpenter, J.M. & Wheeler, W.C. (2006). Systematics of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae), with a phylogenetic consideration of Hamilton's haplodiploidy hypothesis. *Ann. Zool. Fennici.*, 43: 390–406.

Pickett, K.M. & Carpenter, J.M. (2010). Simultaneous analysis on the origin of eusociality in the Vespidae (Insecta: Hymenoptera). *Arthropod. Syst. Phylogeny.*, 68(1): 3–33.

Pratte, M. & Jeanne, R. L. (1984). Antenal drumming behavior in *Polistes* wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Z. Angew.*, 66: 177–188.

Provost, E., Blight, O., Tirard, A. & Renucci, M. (2008). Hydrocarbons and insects' social physiology. In .P. Maes (Ed.), *Insect Physiology: new research* (pp. 19–72). New York: Nova Science Publishers.

Queller, D.C. & Strassmann, J.E. (1989). Measuring inclusive fitness in social wasps. In M.D. Breed & R.E. Page (Eds.), *The genetics of social evolution* (pp 103–122). Boulder: Westview Press.

Ratnieks, F.L.W. (1991). The evolution of genetic odor-cue diversity in social hymenoptera. *Am. Nat.*, 137(2): 202–226.

Richards, O.W. (1978). *The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae*. London, British Museum (Natural History), vii+580p.

Röseler, P.F. (1991). Reproductive competition during colony establishment. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds), *The social biology of wasps* (pp. 309–335). Ithaca: Cornell University Press.

Schmitz, J. & Moritz, R.F.A. (1998). Molecular phylogeny of Vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9: 183–191. DOI.org/10.1006/mpev.1997.0460

Silveira, O.T. (2006). Revision of the subgenus *Kappa* de Saussure of *Mischocyttarus* de Saussure (Hym.; Vespidae, Polistinae, Mischocyttarini). *Zootaxa*, 1321: 1–108.

Silveira, O.T. (2008). Phylogeny of wasps of the genus *Mischocyttarus* de Saussure (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Rev. Bras. Entomol.*, 52(4): 510–549. DOI.org/10.1590/S0085-56262008000400004

Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A. (2002). *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª (Eds). Editora Bookman, Porto Alegre.

Sledge, M.F., Boscaro, F. & Turillazzi, S. (2001). Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49: 401–409. DOI:10.1007/s002650000311

- Sovari, J., Theodora, P., Turillazzi, S., Hakkarainen, H. & Sundsteöm, L. (2008). Food resources, chemical signaling, and nestmate recognition in the ant *Formica aquilonia*. *Behav. Ecol.*, 19: 441–447. DOI: 10.1093/beheco/arm160
- Spradbery, J.P. (1991). Evolution of queen number and queen control. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds), *The social biology of wasps* (pp. 191–231). Ithaca: Cornell University Press.
- Stahls, G. & Nyblom, K. (2000). Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. *Mol. Phylogenetic Evol.*, 15(2): 235–241. DOI.org/10.1006/mpev.1999.0748
- Strassmann, J.E., Meyer, D.C. & Marlock, R.L. (1984). Behavioral castes in the social wasp, *Polistes exclamans* (Hymenoptera: Vespidae). *Sociobiology*, 8: 211–224.
- Sumana, A., Liebert, A.E., Berry, A.S., Switz, G.T., Orians, C.M. & Starks, P.T. (2005). Nest hydrocarbons as cues for philopatry in a paper wasp. *Ethology*, 111: 469–477. DOI: 10.1111/j.1439-0310.2005.01072.x
- Suryanarayanan, S., Hermanson, J.C. & Jeanne, R.L. (2011). A mechanical signal biases caste development in a social wasp. *Curr. Biol.*, 21: 231–235.
- Tannure-Nascimento, I.C., Nascimento, F.S., Turatti, I.C., Lopes, N.P., Trigo, J.R. & Zucchi, R. (2007). Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a Neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae). *Genet. Mol. Res.*, 6(2): 390–396.
- Tibbetts, E.A. (2006). Badges of status in worker and gyne *Polistes dominulus* wasps. *Ann. Zool. Fenn.*, 43: 575–582.
- Torres, V.O., Antonialli-Junior, W.F. & Giannotti, E. (2009). Divisão de trabalho em colônias da vespa social neotropical *Polistes canadensis canadensis* Linnaeus (Hymenoptera, Vespidae). *Rev. Bras. Entomol.*, 53(4): 593–599.

Torres, V.O., Montagna, T.S., Raizer, J. & Antonialli-Junior, W.F. (2012). Division of labor in colonies of the eusocial wasp, *Mischocyttarus consimilis*. *J. Insect Sci.*, 12:21. DOI: 10.1673/031.012.2101.

Wiens, J.J. & Slingluff, J.L. (2001). How lizards turn into snakes: A phylogenetic analysis of body-form evolution in anguid lizards. *Evolution*, 55: 2303–2318. DOI:10.1111/j.0014-3820.2001.tb00744.x

Zara, F.J. & Balestieri, J.B.P. (2000). Behavioural catalogue of *Polistes versicolor* Oliver (Vespidae: Polistinae) post-emergence colonies. *Naturalia*, 25: 301–319.

Zhu, Y., Queller, D.C. & Strassmann, J.A. (2000). A Phylogenetic Perspective on Sequence Evolution in Microsatellite Loci. *J. Mol. Evol.*, 50: 324–338. DOI: 10.1007/s00239991003

Viviana de Oliveira Torres

Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade,  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande

Dourados, 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

vivianabio@yahoo.com.br

**Uso de Sequências do Gene COI e Perfil Químico da Cutícula para Inferir  
Relações entre Espécies de Vespas (Hymenoptera: Polistinae)**

VO TORRES<sup>1</sup>; OT SILVEIRA<sup>2</sup>; LHC ANDRADE<sup>3</sup>; WF ANTONIALLI-  
JUNIOR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.  
vivianabio@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brasil. Orlando@museu-goeldi.br

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.  
luishca@uems.br; williamantonialli@yahoo.com.br

**RESUMO:** Diversas são as ferramentas que podem ser utilizadas para a classificação, taxonomia e para inferir relações filogenéticas de espécies e, dentre estas podemos citar as sequências moleculares e também atualmente tem se estudado o potencial do perfil químico para estes tipos de análises. Portanto, este trabalho objetivou avaliar o potencial do gene COI e do perfil químico da cutícula como ferramentas para recuperar relações entre espécies de vespas Polistinae. Foram coletadas 17 espécies de Polistinae (5 dentro da tribo Epiponini, 5 da tribo Polistini e 7 tribo Mischocyttarini) no estado de Mato Grosso do Sul. Para extração do DNA e sequenciamento do gene COI foram utilizadas pernas medianas dos indivíduos e para análise do perfil químico da cutícula utilizou-se os gásteres, os quais foram submetidos à técnica de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica. Os resultados mostram que a árvore de distância genética neighbor-joining gerada a partir das sequências do gene COI agrupou Epiponini, Polistini e Mischocyttarini de forma congruente com as relações filogenéticas propostas atualmente, mesmo em relação aos subgêneros e espécies. Já o dendrograma de similaridade gerado a partir dos perfis químicos da cutícula só apontou relação mais próxima da filogenia atual e também com a matriz genética quando foram avaliadas as espécies com maior número de colônias coletadas em diferentes ambientes. Portanto, pode-se concluir que tanto sequências genéticas, quanto o perfil químico da cutícula podem ser utilizados para inferir relações entre as espécies de vespas, os quais podem atuar como ferramentas taxonômicas.

**Palavras-chave:** citocromo C oxidase; FTIR-PAS; hidrocarbonetos cuticulares; Polistinae; vespas sociais.

## **Using of the COI Gene Sequences and Cuticle Chemical Profile for Inferring Relationships among Species of Wasps (Hymenoptera: Polistinae)**

ABSTRACT: There are several tools that can be used for classification, taxonomy and to infer phylogenetic relationships of the species and among them we may mention the molecular sequences besides chemical profile of the potential for these types of analyzes have been studied currently. Therefore, this study aimed to evaluate the COI gene potential and of the cuticle chemical profile as tools for retrieving relations among Polistinae wasps. 17 species of Polistinae were collected (5 from Epiponini tribe, 5 from Polistini tribe and 7 Mischocyttarini tribe) in the state of Mato Grosso do Sul. For DNA extraction and sequencing of COI gene middle legs of individuals were used and for analysis of cuticle chemical profile was used the gaster, which were subjected to the technique of Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy. Results show that the family tree distance neighbor-joining generated from the COI gene sequences grouped Epiponini, Polistini and Mischocyttarini congruently with the phylogenetic relationships currently proposed, even for subgenera and species. On the other hand, the similarity dendrogram generated from the cuticle chemical profiles only pointed closer relationships of the current phylogeny and also with genetic matrix whereas species were evaluated with a larger number of colonies which were collected in different environments. Therefore, it can be concluded that the genetic sequences as well the cuticle chemical profile, that it may be used to infer relationships among the wasp species, which can act as taxonomic tools.

Keywords: Cytochrome c oxidase; FTIR-PAS; cuticular hydrocarbons;  
Polistinae; social wasps.

## **Introdução**

Atualmente a família Vespidae é constituída por seis subfamílias: Euparagiinae, Masarinae, Eumeninae, Stenogastrinae, Polistinae e Vespinae, nas quais o comportamento social está presente nas três últimas (Carpenter & Marques, 2001).

A subfamília Polistinae possui distribuição cosmopolita, com maior diversidade na região Neotropical, e no Brasil sua fauna é composta por 21 gêneros e 304 espécies (Carpenter & Marques, 2001). Devido sua ampla distribuição geográfica e características comportamentais essa subfamília tem sido amplamente estudada sob diversos aspectos e, dentre eles podemos destacar as relações filogenéticas entre espécies, subgêneros e gêneros, para os quais ainda não existe uma filogenia bem resolvida. O trabalho pioneiro mais completo sobre a taxonomia desse grupo foi realizado por Richards (1978), o qual descreveu mais de 600 espécies com chaves para gêneros, subgêneros e espécies, além de descrever aspectos da biologia do grupo.

Dentre os trabalhos sobre a filogenia da família Vespidae, temos os de Carpenter (1981, 1991, 2003), que utilizou caracteres morfológicos e comportamentais de inúmeras espécies e cujo resultado foi uma origem monofilética da eussocialidade para as seis subfamílias, a partir de um ancestral comum com castas rudimentares.

Por outro lado, Schmitz & Moritz (1998) e Hines et al. (2007) apresentaram uma hipótese de origem difilética para a eussocialidade, surgindo de forma independente, uma vez em Stenogastrinae e outra em Polistinae + Vespinae. Hines et al. (2007) utilizaram uma base de dados provenientes de fragmentos de quatro genes nucleares (DNA ribossomal 18S e 28S, abdominal-A e RNA polimerase II) de representantes das seis subfamílias.

Um trabalho recente foi realizado por Pickett & Carpenter (2010), os quais compilaram uma das maiores amostras incluindo dados moleculares e caracteres

fenotípicos de todas as subfamílias, permitindo concluir que há apenas uma origem para a eussocialidade entre as seis subfamílias.

Quanto à filogenia de espécies em Polistinae, destaca-se o trabalho de Arévalo et al. (2004) que investigou a filogenia desta subfamília baseada em caracteres morfológicos, comportamentais e moleculares de 69 espécies de diferentes continentes. Neste trabalho os autores testaram a monofilia do gênero *Polistes* e avaliaram as relações filogenéticas entre as demais tribos (Epiponini, Ropalidiini e Mischocyttarini). Dentre os trabalhos que discutem relações filogenéticas entre espécies de vespas Polistinae podemos citar o de Pickett et al. (2006) para *Polistes*, Silveira (2006, 2008) e O'Connor et al. (2011) para espécies de *Mischocyttarus* e Carpenter et al. (2000) para *Polybia*.

De fato, uma árvore filogenética precisa é importante como ponto de partida para os estudos evolutivos e a análise de sequenciamento de DNA é uma técnica que vem se destacando como ferramenta taxonômica que pode fornecer inúmeras evidências de relações filogenéticas de um grupo (Brow, 1983; Arévalo et al., 2004; Hines et al., 2007; Pickett & Carpenter, 2010). Historicamente, as características morfológicas são usadas em combinação com princípios cladísticos (Henning, 1965; Hillis & Wiens, 2000; Zhu et al., 2000) para esclarecer relações filogenéticas. Contudo, análises morfológicas requerem especialistas, o que leva tempo e exige um alto grau de conhecimento e treinamento para reconhecimento de características específicas. Portanto, trabalhos usando sequências de DNA mitocondrial e DNA nuclear têm contribuído para resolução de muitas filogenias (Brow, 1983; Cameron & Mardulyn, 1993; Moore, 1995; Hillis et al., 1996; Arévalo et al., 2004; Pickett & Carpenter, 2010).

Dentre os genes utilizados em análises moleculares, destacam-se os obtidos a partir do DNA mitocondrial (mtDNA), principalmente o gene COI (citocromo C

oxidase subunidade I), o qual tem sido utilizado para avaliar relações filogenéticas (Stahls & Nyblom, 2000; Arévalo et al., 2004; Bajpai & Tewari, 2010), contudo, a grande maioria dos trabalhos utiliza mais de um gene ou mais de uma técnica de análise para inferir filogenia. O gene COI foi utilizado porque atualmente ele faz parte da iniciativa DNA barcoding, no qual cientistas tem se unido para criar um sistema de identificação e descobrimento de espécies por meio de um pequeno trecho de DNA, uma região padronizada do genoma e o gene COI tem se mostrado altamente eficaz em trabalhos realizados animais como pássaros e peixes, além de inúmeras ordens de insetos em que espécies já foram sequenciadas (Hebert et al. 2002; Ratnasingham & Hebert 2007; Sheffield et al. 2009).

Dessa forma, não existe um conjunto de dados em particular que seja o melhor modo de recuperar a filogenia das espécies e, não é apenas um conjunto de caracteres (morfológicos, moleculares, dentre outros) que irá revelar uma filogenia mais próxima da real e sim uma combinação de diferentes metodologias, técnicas e caracteres (Hillis & Wiens, 2000; Moore, 1995; Wiens & Slingluff, 2001; Kather & Martin, 2012).

Por outro lado, os insetos sociais apresentam um sistema de organização complexo e para manter a coesão dentro da colônia e entre os indivíduos estes desenvolveram mecanismos específicos de comunicação química (Ferreira-Caliman et al., 2007) por meio de compostos denominados semioquímicos, os quais auxiliam na busca por parceiros para o acasalamento, alimento ou presa, escolha de local para oviposição, defesa contra predadores e organização de suas colônias (Leal, 2005).

Dentre estes compostos os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) têm recebido maior atenção nas últimas décadas. Estes são parte constituinte da cutícula dos insetos e importantes para evitar dessecação dos indivíduos (Lockey, 1988), além de criar uma barreira contra microorganismos (Provost et al., 2008). Além disso, sabe-se que os HCs

atuam como feromônios de contato, permitindo a identificação de co-específicos, auxiliando na manutenção da estrutura das colônias, separando os indivíduos de acordo com sua função na colônia, seu status fisiológico e seu ranque hierárquico (Provost et al., 2008) atuando, portanto, como uma assinatura química específica do indivíduo.

Os HCs são compostos formados basicamente de hidrogênio e carbono e, dentre as centenas já identificados nos insetos, existem três grandes classes: os *n*-alcanos, os compostos com ramificações metil e os hidrocarbonetos insaturados (Blomquist, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado a importância dos HCs no papel de reconhecimento de indivíduos de uma população (Dapporto et al., 2004a), de colônias (Layton et al., 1994; Tannure-Nascimento et al., 2007, Antonialli-Junior et al., 2007; Tokoro & Makino, 2011), sexo (Cotoneschi et al., 2009), status reprodutivo (Sledge et al. 2001), castas (Tokoro & Makino, 2011), fertilidade (Monnin, 2006; Izzo et al., 2010) e idade (Neves et al., 2012), além de destacar o papel da composição química da cutícula no estabelecimento e manutenção da hierarquia da colônia (Dapporto et al., 2005; Cotoneschi et al., 2009).

Dapporto et al. (2004b) utilizaram este perfil para distinguir diferentes populações de *Polistes dominula* (Christ) do arquipélago de Tuscan e mostraram que os HCs podem representar uma valiosa ferramenta biogeográfica. De fato, Bagnères & Wicker-Thomas (2010) destacam a importância destes HCs como ferramenta taxonômica em insetos sociais e dentre os trabalhos realizados podemos citar o de Kaib et al. (1991) com térmitas, Martin et al. (2008) com formigas e Baracchi (2010) com vespas Stenogastrinae.

Kather & Martin (2012) ressaltam a importância do uso dos HCs como ferramenta taxonômica, desde que utilizada com outros métodos mais convencionais como morfologia, ecologia e biologia molecular. Além disso, esses autores destacam a

confiabilidade dos HCs para este fim, uma vez que são produtos metabólicos estáveis, hereditários e dependentes da espécie.

Dentre os benefícios de se utilizar os HCs como ferramenta taxonômica pode-se citar a alta variação do caráter sob seleção direta, identificação de espécies crípticas, eficiência de tempo e amostragem não destrutiva (Kather & Martin, 2012). Já com relação às limitações é preciso considerar as variações intra-específicas de gênero, idade, maturidade sexual, casta, colônia, dentre outros (Kather & Martin, 2012). Outras fontes importantes de variação intra-específica são a temperatura (Chapman et al., 1995; Frentiu & Chenoweth, 2010) e dieta (Chapman et al., 1995; Stennett & Etges, 1997; Liang & Silverman, 2000). Por outro lado, segundo Espelie et al. (1994) a comparação entre a concentração relativa dos HCs entre indivíduos pode reduzir a variação causada por fatores ambientais.

Dentre as técnicas utilizadas para medir os perfis de HCs em insetos sociais a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é a mais utilizada (Dietermann et al., 1992), sendo confiável e capaz de fornecer boas análises quantitativas, porém, requer diversas etapas de preparação de amostras e pode ser um processo demorado até a obtenção dos resultados porque é necessário um padrão para cada hidrocarboneto a ser quantificado.

Por outro lado, recentemente tem-se utilizado a técnica de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS, “Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy”), capaz de identificar diferentes tipos de compostos, para estudo da distinção de castas, sexo e espécies de formigas (Antonialli- Junior et al., 2007 e 2008) e para distinção de castas, aquisição do perfil químico e parasitismo em vespas Polistinae (Neves et al., 2012 e 2013). Além disso, a partir dos trabalhos de Ferreira et al. (2012) e Neves et al. (2013)

foi possível comprovar a confiabilidade do FTIR-PAS, uma vez que estes trabalhos utilizaram as mesmas amostras usando as técnicas de cromatografia gasosa e FTIR-PAS e obtiveram os mesmos resultados.

A técnica FTIR-PAS é uma medida da radiação absorvida pela amostra e, este processo é realizado na região espectral do infravermelho médio que compreende de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (Silverstein et al., 2000; Skoog et al., 2002), área que abrange a região conhecida como impressão digital (1500 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Esta região é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares, o que possibilita identificar e distinguir radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas nas respectivas amostras, sendo este, o aspecto mais vantajoso desta técnica (Smith, 1999), além de ser relativamente rápida, de fácil manuseio e apresentar boa resolução e alta sensibilidade (Skoog et al., 2002). Esta técnica pode ser utilizada para aplicação em materiais de grande fragilidade e pode ser empregada em medidas de amostras com dimensões reduzidas, como os materiais biológicos (Greene et al., 1992).

Dessa forma, o uso de ferramentas como o perfil químico fornecido pelos HCs e das informações genéticas do gene COI podem ser úteis na discussão de relações entre as espécies. Portanto, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial do gene COI e do perfil químico da cutícula por meio da técnica FTIR-PAS como ferramenta taxonômica para inferir relações de parentesco entre espécies de vespas Polistinae.

## **Material e Métodos**

### *Coleta e identificação das espécies*

As coletas do material biológico foram realizadas em diferentes cidades da região sul do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram coletadas colônias de 17 espécies de Polistinae (5 dentro da tribo Epiponini, 5 da tribo Polistini e 7 tribo

Mischocyttarini) para as análises do perfil químico da cutícula e sequenciamento do gene COI (Citocromo C oxidase subunidade I).

A coleta das colônias foi realizada utilizando-se saco plástico contendo algodão umedecido em éter para rapidamente anestésias os indivíduos. Em seguida, o algodão era retirado para evitar degradação de DNA e outros compostos químicos da cutícula. Após a coleta os indivíduos eram mortos por congelamento e toda a colônia era armazenada e conservada em freezer até a separação das amostras.

#### *Amostragem dos espécimes, extração do DNA, PCR e sequenciamento*

Dentre as 17 espécies de Polistinae coletadas (Tab. 1) o número de indivíduos que tiveram o gene COI sequenciado variou de 4 a 30. Essa variação dependeu do número de indivíduos disponíveis na colônia, do número de colônias coletadas e também da espécie, uma vez que algumas espécies foram mais abundantes do que outras. Para esta análise, de cada indivíduo foi extraída parte de uma perna mediana que foi depositada dentro de um poço de uma placa com 96 poços contendo álcool etílico absoluto (P.A.). Este material foi então enviado para extração de DNA, PCR e sequenciamento das sequências, de acordo com os protocolos a seguir.

O DNA total foi extraído com o uso de Kit de extração de DNA – Qiagen®. Cada reação de PCR continha 5 µL de 10x PCR buffer, 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,4 µL de cada primer, 0,2 µL de Taq polymerase (5u.µL<sup>-1</sup>) e 2µL de DNA extraído. Todas as reações foram realizadas sobre os seguintes ciclos termais: 1 minuto a 94°C seguido por 4 ciclos de 1 minuto a 94°C, 50 segundos a 45°C, 1 minuto a 72°C seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 50 segundos a 45°C, e 1 minuto a 72°C, e, finalmente, 5 minutos a 72°C.

Cada produto e PCR foi purificado usando o Kit Concert Rapid PCR Purification System (GIBCO/BRL) e o sequenciamento foi realizado nas duas direções

utilizando sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems). O alinhamento foi realizado com auxílio do programa MEGA version 3.1 após comparação das sequências forward e reverse e obtenção das sequências consenso (Kumar et al., 2004; Tamura et al., 2007).

Todas as sequências utilizadas nesse estudo estão depositadas no BOLD, a base de dados do Barcode of Life Data System e após publicação, as sequências serão depositadas também no GenBank. Todas as etapas de extração, PCR, sequenciamento e alinhamento foram realizadas no Canadian Centre for DNA Barcoding (CCBD) no BIO (Biodiversity Institute of Ontario), Universidade de Guelph, Ontario, Canadá, sob parceria com o Dr. Paul Hebert.

#### *Análise do perfil químico da cutícula por FTIR-PAS*

Para as análises dos perfis químicos da cutícula foram utilizadas as mesmas fêmeas que tiveram uma das pernas extraídas para sequenciamento do gene COI. Além disso, para aumentar a amostragem por colônia e por espécie, novos indivíduos também foram analisados, portanto, de cada colônia foram avaliadas entre 10 a 15 fêmeas. Os indivíduos acondicionados em freezer tiveram seus gásteres extraídos e cada amostra foi individualizada em eppendorf com identificação da espécie, colônia e número da amostra. A análise foi realizada diretamente no gáster porque é nesta parte do corpo que os hidrocarbonetos estão mais concentrados (Cuvillier-Hot et al., 2001).

Cada amostra era composta por 1 gáster para as espécies de *Polistes* e *Mischocyttarus* ou por um grupo de 3 gásteres em espécies de *Polybia* ou 6 gásteres em *Protopolybia*. Essa variação ocorreu porque os gêneros *Polybia* e *Protopolybia* apresentam indivíduos menores e os espectros apresentavam melhor resolução quando um grupo de gásteres compunha a amostra. Como o objetivo do trabalho foi analisar o

perfil químico da cutícula de cada espécie, o número de gásteres utilizados na amostragem não interferiu nos resultados obtidos.

Cada amostra (gáster ou grupos de gásteres) era colocada em estufa à vácuo por no mínimo 48 horas para minimizar a adsorção de umidade, a qual pode interferir no espectro e, posteriormente, eram levadas ao espectrofotômetro para leitura. Cada amostra foi submetida à técnica de FTIR-PAS em um Espectrofotômetro Thermo-Nicolet Nexus 670, combinado com um detector Fotoacústico (MTEC-300), etapa realizada no laboratório de Espectroscopia Óptica da UEMS.

A técnica FTIR-PAS mede a radiação absorvida pela amostra na região espectral do infravermelho médio, de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (Silverstein et al., 2000; Skoog et al., 2002), a qual é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares e, portanto, possibilita a identificação e distinção de radicais moleculares e dos tipos de ligações químicas (Smith, 1999). Além disso, esta técnica é rápida e não destrutiva (Gordon et al. 1999; Sivakesava & Irudayaraj, 2000), de fácil manuseio, apresentando boa resolução e alta sensibilidade (Skoog et al., 2002).

Durante toda a leitura, o espectrofotômetro foi purificado com ar seco a fim de eliminar vapor de água e o  $\text{CO}_2$  do interferômetro e a câmara fotoacústica acoplada com microfone foi purificada com Hélio gasoso para aumentar a sensibilidade do sistema de fotoacústica. O espectro resultante para cada amostra foi obtido pela média de 64 espectros com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ , no qual foram separados as linhas de absorção entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$  e identificados os picos referentes às vibrações de compostos químicos da cutícula, principalmente de HCs detectados no espectro.

#### *Análises estatísticas*

Para os dados de sequenciamento do gene COI, as divergências das sequências foram calculadas usando um modelo de distância K2P (Kimura-2-parâmetros) e os resultados foram representados graficamente em uma árvore de distância neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) utilizando o programa MEGA. A árvore de distância neighbour-joining foi construída baseada no princípio da máxima verossimilhança e os valores de bootstrap foram indicados na figura obtida.

Os dados dos perfis químicos da cutícula foram analisados pelo método de agrupamento, utilizando a distância euclidiana e o método de ligação UPGMA por meio do programa estatístico R. Para avaliar se o dendrograma gerado refletia a matriz de similaridade na distribuição das espécies analisadas utilizamos o coeficiente de correlação cofenética, sendo definido o valor mínimo de 0,75 como medida de qualidade do ajuste do dendrograma MacGarigal et al. (2000).

A construção do dendrograma foi realizada em duas etapas, na primeira foi utilizado o perfil químico da cutícula das 17 espécies e, como para algumas delas a amostragem tanto de colônias quanto de locais de ocorrência eram comparativamente baixos aos de outras espécies, numa segunda etapa para minimizar o efeito do ambiente e assim, diminuir o efeito da variação intraespecífica foram selecionados apenas as espécies com cinco ou mais colônias coletadas de diferentes locais.

Com o objetivo de comparar os resultados da árvore de distância neighbour-joining gerada pelo sequenciamento do gene COI e do agrupamento formado pela análise de FTIR-PAS foi aplicado o teste de Mantel utilizando as matrizes de similaridade, sendo a significância do teste definida através de simulação de Monte Carlo (999 permutações).

## Resultados e Discussão

A árvore de distância genética neighbor-joining gerada a partir das sequências do gene COI para as 17 espécies de Polistinae está representada na Fig. 1. A partir dos resultados obtidos podemos observar que o agrupamento entre as tribos das espécies analisadas (Epiponini, Polistini e Mischocyttarini) foi semelhante ao encontrado nos estudos de relações filogenéticas já realizados. Além disso, o resultado evidencia uma relação mais estreita entre Polistini e Epiponini. Essa relação estreita (grupo irmão) entre Polistini e Epiponini é observada também no trabalho de Pickett & Carpenter (2010). Contudo, deve-se ressaltar que nossa amostragem não apresenta exemplares da tribo Ropalidiini.

Para o gênero *Mischocyttarus* a árvore (Fig. 1) é congruente com resultados apresentados por Silveira (2008) e mesmo com as relações propostas por Richards (1978), no qual há um subgrupo com espécies representantes do subgênero *Kappa* e outro grupo com espécies correspondentes do subgênero *Phi=Monocyttarus*. Além das espécies *Mischocyttarus matogrossoensis* (Zikán) e *Mischocyttarus cerberus* (Ducke) que fazem parte dos subgêneros *Mischocyttarus stricto sensu* e *Haplometrobius*, respectivamente, com 12 e 74 espécies descritas atualmente (Silveira, 2008).

De acordo com Silveira (2008) o gênero *Mischocyttarus* é composto por 11 subgêneros, sendo *Kappa* monofilético enquanto *Phi(=Monocyttarus)*, não. Em nossos resultados o subgênero *Monocyttarus* está representado pelas espécies *Mischocyttarus consimilis* (Zikán) e *Mischocyttarus gilvus* (Zikán). Este subgênero possui 75 espécies descritas, sendo o maior grupo e com maior distribuição geográfica dentro do gênero (Silveira, 2008).

Atualmente são reconhecidos 4 subgêneros de *Polistes* (Carpenter, 1996) e não mais 12 como apontado por Richards (1978). Destes quatro, apenas *Aphanilopterus* é

encontrado no Novo Mundo, ou seja, somente este pode ser coletado no Brasil e de acordo com as análises realizadas por Pickett & Carpenter (2010) este subgênero é parafilético. Essa relação não foi observada nos resultados (Fig. 1), provavelmente porque poucas espécies foram analisadas. Contudo, as relações entre as espécies de *Polistes* na árvore neighbor-joining é similar às relações encontradas por Richards (1978) e Carpenter et al. (2000) por meio de estudos morfológicos.

Para as espécies de *Polybia* encontramos uma relação mais estreita entre os representantes do mesmo subgênero, *Myrapetra* e *Trichinothorax* (Fig. 1). As relações entre as espécies de *Polybia* não apontam uma parafilia para o grupo (Fig. 1) como já descrita nos trabalhos de Carpenter et al. (2000) e Pickett & Carpenter (2010). Contudo, deve-se ressaltar que apenas dois subgêneros estão representados e que mesmo nos trabalhos citados, que representaram mais subgêneros ainda não foi possível chegar a um consenso, uma vez que é necessário um estudo mais abrangente, envolvendo todos os 11 subgêneros (Carpenter et al., 2000).

Os resultados de Pickett & Carpenter (2010) sugerem uma parafilia para o gênero *Polybia*, no qual o subgênero *Trichinothorax* é parafilético, uma vez que *Polybia raui* (Bequaert) está mais intimamente relacionada com o subgênero *Apopolybia* (*Polybia jurinei* Saussure) e *Polybia stricto sensu*; enquanto o restante das espécies de *Trichinothorax* estão mais relacionadas a *Pedothoeca* e este último, mais próximo de *Epipona* + (*Asteloeca* + *Metapolybia*).

Por fim, destacam-se diversos trabalhos que tem utilizado o sequenciamento do gene COI para inferir e discutir relações filogenéticas e evolutivas nos mais variados grupos de insetos (Mardulyn & Whitfield, 1999; Stahls & Nyblom, 2000; Downton & Austin, 2001; Arévalo et al., 2004; Bajpai & Tewari, 2010; Pickett & Carpenter, 2010; Ptaszyńska et al., 2011). Apesar da maioria destes trabalhos utilizar mais de um gene ou

mais de uma técnica para discutir as relações encontradas entre as espécies, nenhum deles utilizou o gene COI e o perfil químico da cutícula simultaneamente, como proposto neste trabalho. Portanto, os resultados, embora com poucos representantes de diferentes níveis taxonômicos, demonstram que a análise pelo gene COI pode ser uma ferramenta útil para avaliar relações filogenéticas em Polistinae.

Com relação ao perfil químico da cutícula a Fig. 2 representa os espectros médios para cada espécie, em sua respectiva tribo e a posição dos 17 picos utilizados para as análises estatísticas. O número de onda no infravermelho médio, com seus respectivos grupos funcionais e modos vibracionais desses picos podem ser observados na Tab. 2. Estes picos foram definidos por Antonialli-Junior et al. (2007) no primeiro trabalho que utilizou a técnica FTIR-PAS.

O dendrograma de similaridade gerado a partir dos perfis químicos da cutícula das 17 espécies mostrou índice de correlação cofenética=0,89 (Fig. 3), contudo, as relações entre as espécies e mesmo entre os gêneros não são congruentes com as descritas nos trabalhos de Richards (1978), Carpenter (1996), Carpenter et al. (2000), Arévalo et al. (2004), Silveira (2008) e Pickett & Carpenter (2010). Além disso, o teste de mantel realizado a partir das matrizes de similaridade do gene COI e do perfil químico cuticular das 17 espécies não apontou correlação significativa ( $r=0,001$ ,  $p=0,46$ ).

Por outro lado, um novo dendrograma de similaridade utilizando apenas as 6 espécies com maior amostragem de colônias de diferentes populações, apresentou índice significativo de correlação cofenética= 0,78 e, nele pode-se observar a separação dos três grandes grupos (Epiponini, Mischocyttarini e Polistini) analisados, a qual se assemelha à filogenia do grupo. (Fig. 4). Estes resultados mostram uma relação mais estreita entre as espécies da tribo Mischocyttarini + Polistini e não de Epiponini +

Polistini como os resultados gerados pelas relações sugeridas pelo gene COI (Fig. 1) e também pelo trabalho de Pickett & Carpenter (2010).

O teste de mantel realizado a partir dessa nova matriz de similaridade dos perfis químicos cuticulares e da matriz de distância genética dessas mesmas espécies apontou correlação significativa  $r=0,51$  e  $p<0,005$ .

A maior similaridade entre os perfis químicos da cutícula das espécies com fundação independente (*Mischocyttarus* e *Polistes*) pode estar relacionada ao ambiente de coleta (Tab. 1), uma vez que a maioria das colônias de *Mischocyttarus* e *Polistes* estavam nidificadas em ambientes rurais com características semelhantes. Trabalhos como o de Lorenzi et al. (2004) e Khidr et al. (2013) relatam que as colônias podem adquirir componentes do ambiente em que vivem para compor o seu perfil de hidrocarbonetos.

Dentre os componentes do ambiente que podem contribuir para aquisição do perfil de hidrocarbonetos podemos citar a dieta dos indivíduos (Le Moli et al., 1992; Liang & Silverman, 2000; Sovari et al., 2008). Segundo Liang & Silverman (2000) a dieta é um fator importante para o reconhecimento entre companheira de ninho, uma vez que hidrocarbonetos presentes na dieta estão presentes também na cutícula do adulto. Sovari et al. (2008) ao estudar colônias polidômicas da formiga *Formica aquilonia* (Yarrow) comprovaram que o perfil químico da cutícula de operárias é influenciado pela composição da dieta, além disso, o nível de agressão para com uma operária é maior quando esta sofreu mudanças nos itens da dieta e na disponibilidade de alimento. Portanto, ainda que em parte a composição dos HCs de uma espécie seja devido a fatores genéticos (Kather & Martin, 2012) a dieta tem se destacado como um dos principais responsáveis pela aquisição do perfil químico dos indivíduos.

Por fim, apesar de diversos estudos demonstrarem a importância desses HCs para distinção de populações, de colônias, status reprodutivo, castas, fertilidade e idade, nenhum deles até o momento tinha investigado o potencial desses compostos para estudar relações entre espécies de vespas sociais, apesar de Kather & Martin (2012) e Khidr et al. (2013) já destacarem sua importância como ferramenta taxonômica adicional.

De fato, os HCs fornecem um número de compostos espécie-específicos que podem ser utilizados para delimitar espécies e podem auxiliar na especiação recente e espécies crípticas, complementando métodos convencionais como a genética e a morfologia (Kather & Martin, 2012).

Portanto, os resultados apresentados aqui, permitem inferir que as relações geradas pela variação dos perfis químicos da cutícula entre espécies, bem como de suas sequências genéticas podem atuar de forma complementar como ferramentas taxonômicas. No caso dos compostos cuticulares o efeito do ambiente deve ser levado em conta e seus efeitos devem ser diluídos pela análise de um número substancial de colônias de uma mesma espécie de diferentes locais e ambientes. Kather & Martin (2012), de fato, já ressaltaram a importância da forma integrada de diferentes métodos de análises, incluindo desde métodos tradicionais como a morfologia e comportamentais até dados moleculares.

## **Agradecimentos**

A CAPES pelo fornecimento de bolsa de doutorado à primeira autora. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade de WFAJ.

## Referências Bibliográficas

- Antonialli-Junior, W.F., Lima, S.M., Andrade, L.H.C. & Suárez, Y.R. (2007). Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 6: 492–499.
- Antonialli-Junior, W.F., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R. & Lima S.M. (2008). Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 7: 559–566.
- Arévalo, E., Zhu, Y., Carpenter, J.M. & Strassmann, J.E. (2004). The phylogeny of the social wasp subfamily Polistinae: evidence from microsatellite flanking sequences, mitochondrial COI sequence, and morphological characters. *Biomed. Cent. Evol. Biol.*, 4: 1471–2148. DOI:10.1186/1471-2148-4-8.
- Bagnères, A.G. & Wicker-Thomas, C. (2010). Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons. In G.J. Blomquist & A.G. Bagnères (Eds.), *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology* (pp. 75–99). New York: Cambridge University Press.
- Bajpai, N. & Tewari, R.R. (2010). Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus *Sarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). *J. Genet.*, 89(1): 51–54. DOI: 10.1007/s12041-010-0010-5.
- Baracchi, D., Dapporto, L., Tesseo, S., Hashim, R. & Turillazzi, S. (2010). Medium molecular weight polar substance of the cuticle as tools in the study of the taxonomy, systematics and chemical ecology of tropical hover wasps (Hymenoptera: Stenogastrinae). *J. Zool. Syst. Evol.*, 48(2): 109–114. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2009.00543.x.

- Blomquist, G.J. (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In G.J. Blomquist & A.G. Bagnères (Eds.), *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology* (pp. 19–34). New York: Cambridge University Press.
- Brown, W.M. (1983). Evolution of Animal Mitochondrial DNA. In M. Nei & R.K. Koehn (Eds.), *Evolution of Genes and Proteins* (pp. 62–68). Sunderland: Sinauer.
- Cameron, S.A. & Mardulyn, P. (1993). Multiple origins of advanced eusociality in bees inferred from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 8687–8691.
- Carpenter, J.M. (1981). The phylogenetic relationships and natural classification of the Vespoidea (Hymenoptera). *Syst. Entomol.*, 7: 11–38.
- Carpenter, J.M. (1991). Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds.), *The social biology of wasps* (pp. 7–32). Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Carpenter, J.M. (1996). Phylogeny and biogeography of *Polistes*. In S. Turillazzi & M.J. West-Eberhard (Eds.), *Natural History and Evolution of Paper-Wasps* (pp. 18–57). Oxford: Oxford University Press.
- Carpenter, J.M. (2003). On "Molecular phylogeny of Vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps". *Am. Mus. Novit.*, 3389: 1–20.
- Carpenter, J.M., Kojima, J. & Wenzel, J.W. (2000). *Polybia*, Paraphyly, and Polistinae Phylogeny. *Am. Mus. Novit.*, 3298: 1–24. DOI: 10.1206/0003-0082(2000)298<0001:PPAPP>2.0.CO;2.
- Carpenter, J.M. & Marques, O.M. (2001). Contribuição ao estudo dos vespídeos do Brasil (Insecta, Hymenoptera, Vespoidea, Vespidae). Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia. Publicações Digitais, Vol. II.

Chapman, R.F., Espelie, K.E. & Swords, G.A. (1995). Use of cuticular lipids in grasshopper taxonomy: A study of variation in *Schistocerca gossypi* (Thomas). *Biochem. Syst. Ecol.*, 23: 383–398. DOI.org/10.1016/0305-1978(95)00032-P.

Cotoneschi, C., Dani, F.R., Cervo, R., Scala, C., Strassmann, J.E., Queller, D.C. & Turillazzi S. (2009). *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) larvae show different cuticular patterns according to their sex: workers seem not use this chemical information. *Chem. Senses.*, 34: 195–202. DOI: 10.1093/chemse/bjn079.

Cuvillier-Hot, V., Cobb, M., Malosse, C. & Peeters, C. (2001). Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J. Insect. Physiol.*, 47: 485–493. DOI.org/10.1016/S0022-1910(00)00137-2.

Dapporto, L., Theodora, P., Spacchini, C., Pieraccini, G. & Turillazzi, S. (2004a). Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). *Insect. Soc.*, 51: 279–286. DOI 10.1007/s00040-004-0738-0.

Dapporto, L., Palagi, E. & Turillazzi, S. (2004b). Cuticular hydrocarbons of *Polistes dominulus* as a biogeographic tool: a study of populations from the Tuscan archipelago and surrounding areas. *J. Chem. Ecol.*, 30: 2139–2151. DOI: 10.1023/B:JOEC.0000048779.47821.38.

Dapporto, L., Sledge, F.M. & Turillazzi, S. (2005). Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests (Hymenoptera, Vespidae). *J. Insect Physiol.*, 51: 969–973. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2005.04.011.

Dietermann, V., Peeters, C., Liebig, J., Thivet, V. & Hölldobler, B. (1992). Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 10341–10346. DOI:10.1073/pnas.1834281100.

- Dowton, M. & Austin, A.D. (2001). Simultaneous analysis of 16S, 28S, COI and morphology in the Hymenoptera: Apocrita – evolutionary transitions among parasitic wasps. *Biol. J. Linn. Soc.*, 74(1): 87–111. DOI:10.1111/j.1095-8312.2001.tb01379.x.
- Espelie, K., Chapman, R.F. & Sword, G.A. (1994). Variation in the surface lipids of the grasshopper, *Schistocerca americana* (Drury). *Biochem. Syst. Ecol.*, 22: 563–575. DOI.org/10.1016/0305-1978(94)90068-X.
- Ferreira, A.C., Cardoso, C.A.L., Neves, E.F., Suárez, Y.R. & Antonialli-Junior, W.F. (2012). Distinct linear hydrocarbon profiles and chemical strategy of facultative parasitism among *Mischocyttarus* wasps. *Genet. Mol. Res.*, 11(4): 4351–4359. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012.September.25.3>.
- Ferreira-Caliman, M.J., Cabral, G.C.P., Mateus, S., Turatti, I.C.C., Nascimento, F.S. & Zucchi, R. (2007). Composição química da epicutícula de 77 operárias de *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*: 1–2.
- Frentiu, F.D. & Chenoweth, S.F. (2010). Clines in cuticular hydrocarbons in two *Drosophila* species with independent population histories. *Evolution*, 64: 1784–1794. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2009.00936.x.
- Gordon, S.H., Jones, R.W., McClelland, J.F., Wicklow, D.T. & Greene, R.V. (1999). Transient infrared spectroscopy for detection of toxigenic fungi in corn: potential for on-line evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5267–5272. DOI: 10.1021/jf990011f.
- Greene, R.V., Gordon, S.H., Jackson, M.A. & Bennett, G.A. (1992). Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 1144–1149. DOI:10.1021/jf00019a011.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & de Waard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 313–321.

- Henning, W. (1965). Phylogenetic Systematics. *Annu. Rev. Entomol.*, 10: 97–116.
- Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K. (1996). *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland.
- Hillis, D.M. & Wiens, J.J. (2000). Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. In J.J. Wiens (Ed.), *Phylogenetic Analysis of Morphological Data* (pp. 1-19). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Hines, H.M., Hunt, J.H., O'Connor, T.K., Gillespie, J.J. & Cameron, S.A. (2007). Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(9): 3295–3299. DOI:10.1073/pnas.0610140104.
- Izzo, A., Wells, M., Huang, Z. & Tibbetts, E. (2010). Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64: 857–874. DOI: 10.1007/s00265-010-0902-7.
- Kaib, M., Brandl, R. & Bagine, R.K.N. (1991). Cuticular hydrocarbons profiles: a valuable tool in termite taxonomy. *Naturwissenschaften*, 78: 176–179. DOI:10.1007/BF01136208.
- Kather, R. & Martin, S.J. (2012). Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. *Physiol. Entomol.*, 37: 25–32. DOI: 10.1111/j.1365-3032.2011.00826.x.
- Khidr, S.K., Linforth, R.S.T & Hardy, I.C.W. (2013). Genetic and environmental influences on the cuticular hydrocarbon profiles of *Goniozus* wasps. *Entomol. Exp. Appl.*, 147(2): 175–185. DOI:10.1111/eea.12058.
- Kumar, J.P., Jamal, T., Doetsch, A., Turner, F.R. & Duffy, J.B. (2004). CREB binding protein functions during successive stages of eye development in *Drosophila*. *Genetics*, 168(2): 877–893. DOI:10.1534/genetics.104.029850.

- Layton, J.M., Camann, M.A. & Espelie, K.E. (1994). Cuticular lipids profiles of queens, workers and males of social wasp *Polistes metricus* say are colony-specific. *J. Chem. Ecol.*, 20(9): 2307–2321. DOI: 10.1007/BF02033205.
- Leal, W.S. (2005). Pheromone reception. *Top. Curr. Chem.*, 240: 1-36. DOI: 10.1007/b98314.
- Le Moli, F., Mori, A. & Grasso, D. A. (1992). Nestmate and conspecific non-nestmate recognition in *Formica cunicularia* Latr.: the effect of diet difference. In J. Billen (Ed.) *Biology and evolution of social insects* (pp. 161–165). Leuven, Belgium: Leuven University Press.
- Liang, D. & Silverman, J. (2000). ‘You are what you eat’: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften*, 87: 412–416.
- Lockey, K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89: 595 – 645. DOI.org/10.1016/0305-0491(88)90305-7.
- Lorenzi, M.C., Sledge, M.F., Laiolo, P., Sturlini, E. & Turillazzi, S. (2004). Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. *J. Insect. Physiol.*, 50(10): 935–941. DOI.org/10.1016/j.jinsphys.2004.07.005.
- MacGarigal, K., Cushman, S.A. & Stafford, S.G. (2000). *Multivariate statistics for wildlife and ecology research*. New York: Springer.
- Mardulyn, P. & Whitfield, J.B. (1999). Phylogenetic signal in the COI, 16S, and 28S genes for inferring relationships among genere of *Microgastrinae* (Hymenoptera: Braconidae): evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 12(3): 282–294. DOI:10.1006/mpev.1999.0618.

- Martin, S.J., Helantera, H. & Drijfhout, F.P. (2008). Evolution of species-specific cuticular hydrocarbon patterns in *Formica* ants. *Biol. J. Linn. Soc.*, 95: 131–140. DOI:10.1111/j.1095-8312.2008.01038.x.
- Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann. Zool. Fenn.*, 43: 515–530.
- Moore, W.S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49: 718–726.
- Neves, E.F, Andrade, L.H.A, Suárez, Y.R, Lima, S.M. & Antonialli-Junior, W.F. (2012). Age-related changes in the surfasse pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genet. Mol. Res.*, 11(3): 1891–1898. DOI: 10.4238/2012.July.19.8.
- Neves, E.F., Montagna, T.S., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R., Lima S.M. & Antonialli-Junior, W.F. (2013). Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 86(1): 69–77. DOI: <http://dx.doi.org/10.2317/JKES1207610.1>.
- O'Connor, T.K., Starr, C.K. & Cameron, S.A. (2011). The Neotropical social wasp *Mischocyttarus 'alfkenii'* Ducke (Hymenoptera: Vespidae) is a pair of ethospecies. *Syst. Entomol.* 36: 446–452. DOI 10.1111/j.1365-3113.2011.00575.x.
- Pickett, K.M., Carpenter, J.M. & Wheeler, W.C. (2006). Systematics of *Polistes* (Hymenoptera: Vespidae), with a phylogenetic consideration of Hamilton's haplodiploidy hypothesis. *Ann. Zool. Fennici.*, 43: 390–406.
- Pickett, K.M. & Carpenter, J.M. (2010). Simultaneous analysis on the origin of eusociality in the Vespidae (Insecta: Hymenoptera). *Arthropod Syst. Phylogeny*, 68(1): 3–33.

- Provost, E., Blight, O., Tirard, A. & Renucci, M. (2008). Hydrocarbons and insects' social physiology. In R.P. Maes (Ed.), *Insect Physiology: new research* (pp. 19–72). Nova Science Publishers.
- Ptaszyńska, A.A., Letowski, J., Gnat, S. & Malek, W. (2011). Application of COI sequences in studies of phylogenetic relationships among 40 Apionidae species. *J. Insect Sci.*, 12: 16. available online: [insectscience.org/12.16](http://insectscience.org/12.16). DOI: 10.1673/031.012.1601.
- Ratnasingham, S & Hebert, P.D.N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes*: 1-10. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Richards, O.W. (1978). *The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae*. London: British Museum of Natural History.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- Schmitz, J. & Moritz, R.F.A. (1998). Molecular phylogeny of Vespidae (Hymenoptera) and the evolution of sociality in wasps. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 9: 183–191. DOI.org/10.1006/mpev.1997.0460.
- Sheffield, C.S., Hebert, P.D.N., Kevan, P.G. & Packer, L. (2009). DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9:196–207. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02645.x
- Silveira, O.T. (2006). Revision of the subgenus *Kappa* de Saussure of *Mischocyttarus* de Saussure (Hym.; Vespidae, Polistinae, Mischocyttarini). *Zootaxa*, 1321: 1–108.
- Silveira, O.T. (2008). Phylogeny of wasps of the genus *Mischocyttarus* de Saussure (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Rev. Bras. Entomol.*, 52(4): 510–549. DOI.org/10.1590/S0085-56262008000400004.

- Silverstein, R.M. & Webster, F.X. (2000). Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6ª ed. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro.
- Sivakesava, S. & Irudayaraj, J. (2000). Analysis of potato chips using FTIR photoacoustic spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.*, 80(12): 1805–1810.  
DOI:10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1805::AID-JSFA710>3.0.CO;2-L.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A. (2002). Princípios de Análise Instrumental. 5ª ed. Editora Bookman, Porto Alegre.
- Sledge, M.F., Boscaro, F. & Turillazzi, S. (2001). Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49: 401–409. DOI:10.1007/s002650000311.
- Smith, B.C. (1999). Infrared spectral interpretation: A systematic approach. Boca Raton: CRC Press.
- Sovari, J., Theodora, P., Turillazzi, S., Hakkarainen, H. & Sundström, L. (2008). Food resources, chemical signaling, and nest mate recognition in the ant *Formica aquilonia*. *Behav. Ecol.*, 19: 441–447. DOI:10.1093/beheco/arm160.
- Stahls, G. & Nyblom, K. (2000). Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. *Mol. Phylogenetic Evol.*, 15(2): 235–241. DOI.org/10.1006/mpev.1999.0748.
- Stennett, M.D. & Etges, W.J. (1997). Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. III. Epicuticular hydrocarbon variation is determined by use of different host plants in *Drosophila mojavensis* and *Drosophila arizonae*. *J. Chemic. Ecol.*, 23: 2803–2824. DOI: 10.1023/A:1022519228346.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596–1599.

DOI:10.1093/molbev/msm092.

Tannure-Nascimento, I.C., Nascimento, F.S., Turatti, I.C., Lopes, N.P., Trigo, J.R. & Zucchi, R. (2007). Colony membership is reflected by variations in cuticular hydrocarbon profile in a Neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera, Vespidae). *Genet. Mol. Res.*, 6(2): 390–396.

Tokoro, M. & Makino, S. (2011). Colony and caste specific cuticular hydrocarbon profiles in the common Japanese hornet, *Vespa analis* (Hymenoptera, Vespidae). *JARQ*, 45(3): 277–283. DOI: 10.6090/jarq.45.277.

Wiens, J.J. & Slingluff, J.L. (2001). How lizards turn into snakes: A phylogenetic analysis of body-form evolution in anguid lizards. *Evolution*, 55: 2303-2318.

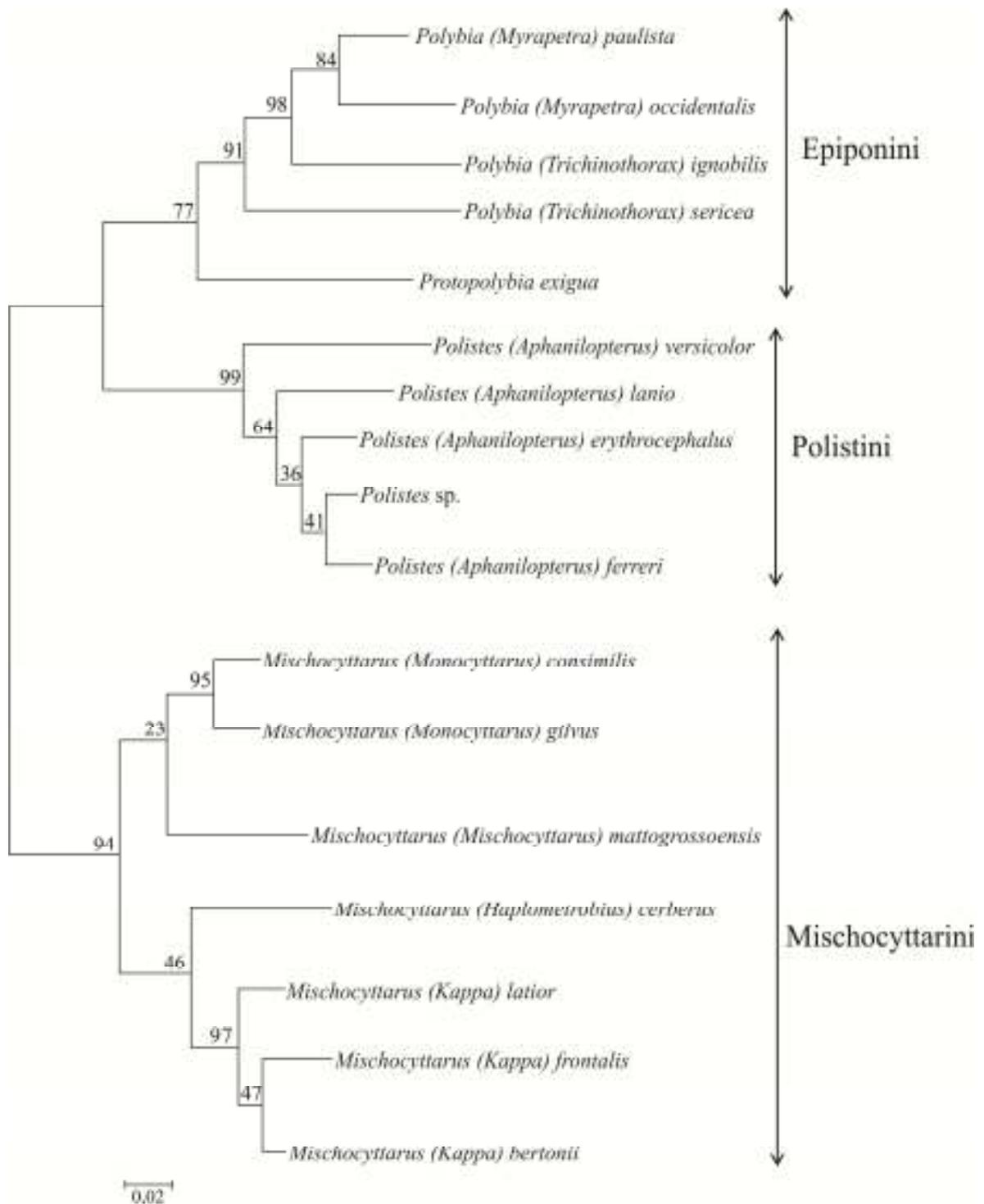
Zhu, Y., Queller, D.C. & Strassmann, J.A. (2000). A Phylogenetic Perspective on Sequence Evolution in Microsatellite Loci. *J. Mol. Evol.*, 50: 324–338. Doi: 10.1007/s002399910036.

**Tabela I.** Local e número de colônias de cada espécie coletada em diferentes municípios do Estado do Mato Grosso do Sul e utilizadas para as análises do gene COI e dos perfis químicos da cutícula.

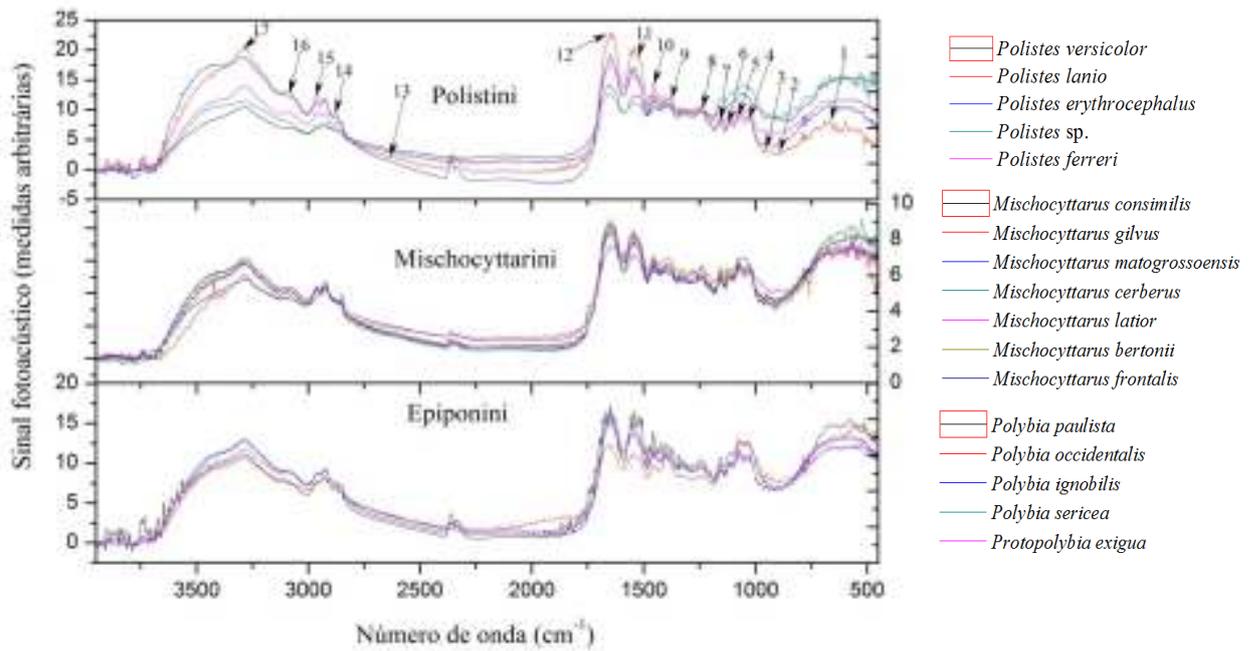
<b>Espécie</b>	<b>Número de colônias</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Ambiente de coleta</b>
<i>Polybia paulista</i>	10 colônias	Dourados (4), Ivinhema (4) e Mundo Novo (2)	Ambiente rural e urbano
<i>Polybia occidentalis</i>	6 colônias	Dourados (2), Ivinhema (3) e Mundo Novo (1)	Ambiente rural e urbano
<i>Polybia ignobilis</i>	3 colônias	Dourados (2) e Fátima do Sul (1)	Ambiente rural e região de mata
<i>Polybia sericea</i>	3 colônias	Dourados (2) e Fátima do Sul (1)	Ambiente rural e próximo de mata ciliar
<i>Protopolybia exigua</i>	2 colônias	Dourados (1) e Fátima do Sul (1)	Ambiente rural e urbano
<i>Polistes versicolor</i>	6 colônias	Dourados (3) e Mundo Novo (3)	Ambiente rural e urbano
<i>Polistes lanio</i>	1 colônia	Antônio João	Ambiente rural
<i>Polistes erythrocephalus</i>	1 colônia	Nova Andradina	Ambiente rural
<i>Polistes</i> sp.	1 colônia	Dourados	Ambiente rural
<i>Polistes ferreri</i>	8 colônias	Mundo Novo	Ambiente rural e urbano
<i>Mischocyttarus consimilis</i>	8 colônias	Dourados (3), Fátima do Sul (1), Mundo Novo (4)	Ambiente rural e urbano
<i>Mischocyttarus gilvus</i>	2 colônias	Mundo Novo	Ambiente urbano
<i>Mischocyttarus mattogrossoensis</i>	1 colônia	Mundo Novo	Ambiente rural
<i>Mischocyttarus cerberus</i>	1 colônia	Dourados	Ambiente urbano
<i>Mischocyttarus latior</i>	5 colônias	Dourados (3) e Mundo Novo (2)	Ambiente rural e urbano
<i>Mischocyttarus frontalis</i>	2 colônias	Dourados	Ambiente rural
<i>Mischocyttarus bertonii</i>	6 colônias	Dourados (3) e Mundo Novo (3)	Ambiente rural e urbano

**Tabela II.** Picos dos espectros médios utilizados para análises de similaridades entre as espécies de Polistinae: Número de onda, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho dos gásteres das espécies de Polistinae.

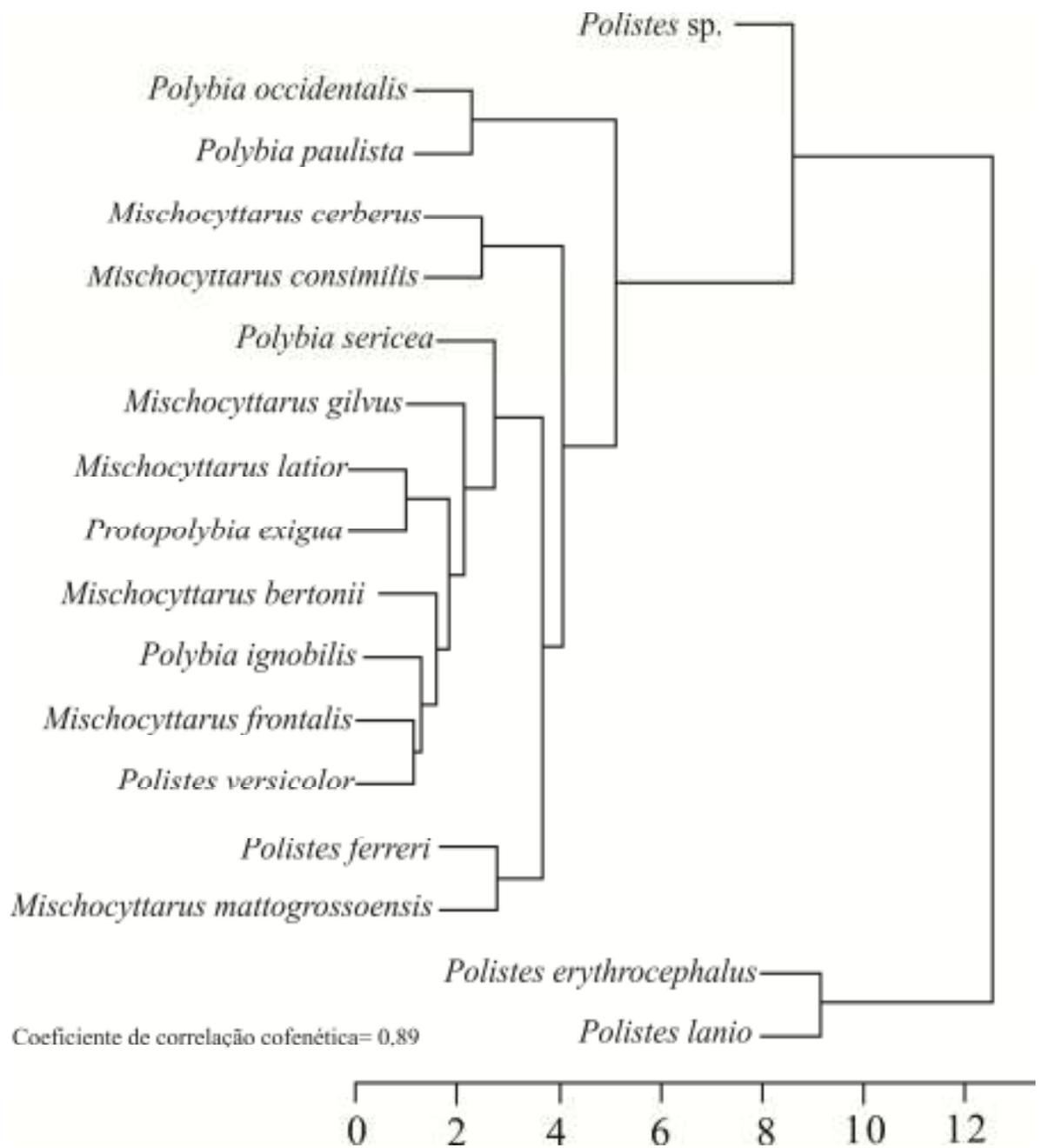
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional	Modo vibracional
667, 895, 953	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
1030, 1076, 1115, 1157	No plano C-H (benzeno)	Dobra
1238	-C-N	Estiramento
1377	C-CH <sub>3</sub>	Dobra simétrica
1450	C-CH <sub>2</sub>	Tesoura
1524	N-H	Dobra
1651	-C=O	Estiramento
2634	-C-N and -N-H	Dobra de sobreposição
2877	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Estiramento simétrico
2962	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Estiramento assimétrico
3082	N-H	Dobra de sobreposição
3290	-N-H	Estiramento



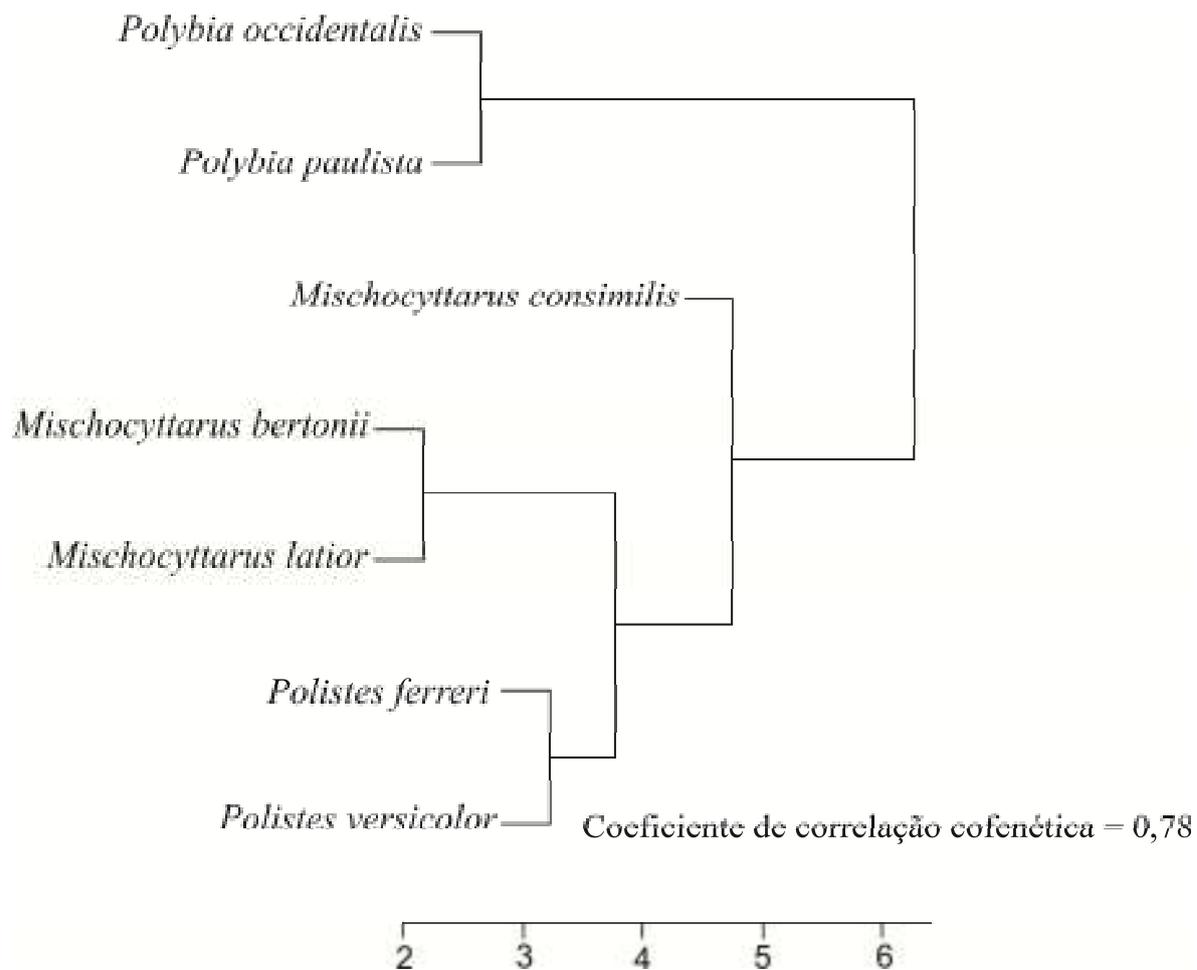
**Fig. 1.** Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining, baseada nas sequências do gene COI de 17 espécies de vespas Polistinae utilizando o princípio da máxima verossimilhança. Os valores de bootstrap estão indicados nos nós.



**Fig. 2.** Curva média para cada grupo de espectro de absorção no infravermelho médio dos gásteres de diferentes espécies de Polistini, Mischocyttarini e Epiponini, com indicação dos picos utilizados para a análise de similaridade.



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade utilizando o perfil químico da cutícula de 17 espécies de vespas Polistinae.



**Fig. 4.** Dendrograma de similaridade utilizando o perfil químico da cutícula em espécies de vespas Polistinae com cinco ou mais colônias coletadas.

Viviana de Oliveira Torres

Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade,  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande

Dourados, 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

vivianabio@yahoo.com.br

**Perfil Químico de Ninhos de Vespas Polistinae como Ferramenta para  
Distinção Intra e Interespecífica**

VO TORRES<sup>1</sup>; D SGUARIZI-ANTONIO<sup>2</sup>; ELB FIRMINO<sup>2</sup>; WF  
ANTONIALLI-JUNIOR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, Brasil.

vivianabio@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados-MS, Brasil.

denisesguarizi@hotmail.com; ellen\_barbosa16@hotmail.com;

williamantonialli@yahoo.com.br

RESUMO: Têm aumentado o número de trabalhos que destacam a importância do papel dos hidrocarbonetos cuticulares no processo de reconhecimento intra e interespecífico em insetos sociais. Neste sentido, o material do ninho contribui para a assinatura química da colônia, uma vez que o adulto em contato com o substrato pode adquirir compostos presentes no ninho. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o perfil químico do substrato do ninho pode ser usado para estabelecer relações intra e interespecífica entre vespas Polistinae por meio da técnica de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica. Foram avaliadas as relações entre as assinaturas químicas da cutícula dos adultos e dos ninhos de suas respectivas colônias, bem como as relações entre 6 espécies de vespas Polistinae, baseadas na composição química dos substratos de seus ninhos. Os resultados permitem inferir que a composição química da cutícula do adulto e do substrato do ninho podem ser usados como ferramenta, ao menos complementar, para análises de relações intra e interespecíficas e que os elementos químicos que compõem o substrato do ninho também fazem parte da composição química cuticular do adulto, portanto, há similaridade entre ambos. Além disso, existem diferenças significativas entre o perfil químico do substrato dos ninhos de diferentes espécies, cuja variação está relacionada ao tipo de ambiente em que as colônias nidificam.

Palavras-chave: hidrocarbonetos cuticulares, ninho, dieta, cutícula, *Polybia*.

## **Chemical Profile of the Polistinae Wasp Nests as a Tool for Distinguishing Intra-and Interspecific**

ABSTRACT: The number of studies that highlight the importance of the cuticular hydrocarbons role in the intra-and interspecific recognition process in social insects have been increased. In this sense, the nest material contributes to the colony chemical signature as the adult in contact with the substrate can acquire compounds that are presented in the nest. Thus, the aim of this study was to evaluate whether the substrate chemical profile of the nest can be used to establish intra-and interspecific relationships among Polistinae wasps through the technique of Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy. The relationships among the chemical signatures of the cuticle of adults and nests of their respective colonies were evaluated as well as the relations among Polistinae wasps species, based on the chemical composition of the substrates from their nests. The results allow us to conclude that the cuticle chemical composition of the adult and of the nest substrate can be used as tools, at least complementary for analyzes of intra-and interspecific relationships and that chemical elements that compose the nest substrate also make part of the cuticle chemical composition of the adult, so there are similarities between them. Moreover, there are significant differences among the nests substrate chemical profile of different species, whose variation is related to the kind of environment in which colonies are nested.

Key-words: cuticular hydrocarbons, nests, diet, cuticle, *Polybia*.

## **Introdução**

Os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são compostos formados basicamente de hidrogênio e carbono e são parte constituinte da camada lipídica que recobre a cutícula dos insetos, cuja função primária é evitar dessecação dos indivíduos (Lockey, 1988). Além disso, esses compostos atuam como feromônios de contato, dando uma assinatura química específica ao indivíduo e permitindo que por meio do perfil desses HCs indivíduos co-específicos sejam identificados e que a estrutura hierárquica da colônia seja mantida (Provost et al., 2008).

Os trabalhos de Howard et al. (1982), Bonavita-Cougourdan et al. (1987) e Breed et al. (1988) foram os primeiros a destacar a importância do papel dos HCs no processo de reconhecimento em insetos sociais. Contudo, atualmente, diversos estudos têm demonstrado a importância desses compostos no papel de reconhecimento intraespecífico, distinguindo populações (Dapporto et al., 2004a), colônias (Layton et al., 1994; Tannure-Nascimento, et al. 2007, Antonialli-Junior, et al. 2008), sexo (Cotoneschi et al., 2009), status reprodutivo (Sledge et al., 2001), fertilidade (Monnin, 2006; Izzo et al., 2010), idade (Neves et al., 2012) e, por consequência seu papel no estabelecimento e manutenção da hierarquia nas colônias (Dapporto et al., 2005; Cotoneschi et al., 2009).

Os HCs, portanto, são os principais compostos envolvidos nos mecanismos de reconhecimento atuando como sinais químicos na comunicação nos insetos sociais (Lorenzi et al., 1997; Blomquist & Bagnères, 2010; Richard & Hunt, 2013). Estes compostos presentes na cutícula são formados tanto por componentes genéticos (Ratnieks, 1991; Page et al., 1991; Arnold et al., 1996; Blomquist & Bagnères, 2010; Kather & Martin, 2012) quanto por ambientais (Ratnieks, 1991; Gamboa, 1996; Blomquist & Bagnères, 2010).

Dentre os componentes ambientais que contribuem para compor o perfil de hidrocarbonetos cuticulares está a dieta (Le Moli et al., 1992; Liang & Silverman, 2000; Buczkowski et al., 2005; Sovari et al., 2008), importante para o reconhecimento entre companheiras de ninho, uma vez que hidrocarbonetos presentes na dieta estão presentes também na cutícula do adulto (Liang & Silverman, 2000; Sovari et al., 2008) prova disto é que o nível de agressão entre operárias aumenta quando estão sob dieta diferente e diminui, quando ocorre o contrário (Sovari et al., 2008).

Por outro lado, a interação e/ou comunicação entre indivíduos adultos também é importante para compor o perfil de HCs da colônia. Parte destes compostos, de fato, podem ser adquiridos após a emergência do adulto por meio de interações sociais (Pfennig et al., 1983; Gamboa et al., 1986a; Panek et al., 2001; Lorenzi et al., 2004; e Neves et al., 2012).

As próprias secreções glandulares podem contribuir para a formação do perfil químico dos indivíduos (Bagnères & Morgan, 1991; Soroker et al., 1994; Dani et al., 1996) e, conseqüentemente ter papel importante nos mecanismos de reconhecimento. Já foi comprovado que em formigas a glândula pós-faringeal possui hidrocarbonetos que são encontrados na cutícula dos adultos (Bagnères & Morgan, 1991; Soroker et al., 1994), que devem ser transmitidos durante comportamentos de autolimpeza ou em grupo. Em abelhas, esta relação entre os hidrocarbonetos cuticulares com as secreções mandibulares foi descrita em *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier) por Cruz-Landim et al. (2012). Já em vespas, Mitra & Gadagkar (in Press) afirmam que parte dos elementos que compõem o perfil de hidrocarbonetos cuticulares de *Ropalidia marginata* (Lepeletier) são produzidos pelas glândulas de Dufour.

O próprio odor do ninho tem se mostrado importante para compor a assinatura química da colônia. Ross & Gamboa (1981) e Gamboa et al. (1986a,b) descreveram que

operárias e gines recentemente emergidas precisam ficar expostas ao seu ninho natal por um certo período para “aprender” a reconhecer suas companheiras de ninho e adquirir o odor característico da colônia.

Testes realizados por Espelie & Hermann (1990), Espelie et al. (1990) e Singer & Espelie (1997) comprovaram que a mistura de hidrocarbonetos do favo é similar à cutícula dos indivíduos adultos e imaturos e que a exposição aos hidrocarbonetos do ninho, durante a vida adulta é importante para o reconhecimento, uma vez que as operárias não eram capazes de reconhecer seus próprios ninhos após remoção dos hidrocarbonetos.

Gamboa et al. (1996) relata que os adultos, de fato, podem absorver componentes do próprio material do ninho, o que contribui para a assinatura característica dos adultos na colônia e auxilia no processo de reconhecimento de companheiras de ninho. Em colônias de *Polistes dominula* (Christ) fêmeas são capazes de reconhecer seu sítio natal mesmo após um período de hibernação (diapausa) de acordo com Sumana et al. (2005). Portanto, é inegável a importância que os hidrocarbonetos do ninho têm para compor a assinatura química cuticular da colônia.

Atualmente a técnica mais utilizada para identificar relações intra e interespecíficas por meio do perfil de hidrocarbonetos cuticulares é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (Dietermann et al., 1992). Contudo, desde 2007 tem sido estudado o potencial de utilização da técnica de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS, “Fourier Transform–Infrared Photoacoustic Spectroscopy”) para leitura de hidrocarbonetos cuticulares. Esta técnica já foi utilizada com sucesso para investigar relações intra e interespecíficas em formigas e vespas sociais (Antoniali-Junior et al., 2007 e 2008; Neves et al., 2012 e 2013).

Portanto, uma vez que trabalhos prévios já demonstraram a relação entre os elementos químicos do substrato do ninho e a composição da assinatura química dos adultos em colônias de vespas sociais, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o perfil químico do substrato do ninho pode ser usado para estabelecer relações intra e interespecífica entre vespas Polistinae por meio da técnica FTIR-PAS.

## **Material e Métodos**

### *Coleta e identificação das espécies*

As coletas do material foram realizadas em diferentes municípios do Estado de Mato Grosso do Sul. Foram utilizadas 6 espécies, das tribos: Epiponini: *Polybia paulista* (Ihering) e *Polybia occidentalis* (Olivier); Mischocyttarini: *Mischocyttarus consimilis* (Zikán) e *Mischocyttarus latior* (Kappa); e Polistini: *Polistes versicolor* (Olivier) e *Polistes ferreri* (Saussure). O número de colônias e local das coletas de cada espécie estão listados na Tabela I.

As colônias e seus respectivos ninhos foram coletados envolvendo-os com saco plástico contendo algodão umedecido em éter para anestesiá-los. Logo em seguida, o algodão era retirado para evitar que o éter degradasse compostos químicos da cutícula. No laboratório toda a colônia e amostras dos substratos dos ninhos foram individualizadas em eppendorfs e conservadas por congelamento até a realização da técnica FTIR-PAS.

As espécies foram identificadas pelo especialista, Prof. Dr. Orlando Tobias Silveira, professor associado do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém-PA).

*Análise das relações entre os compostos químicos do substrato do ninho e da cutícula dos adultos*

Foram avaliadas 10 colônias de *P. paulista* e 10 de *M. consimilis*, por serem as espécies mais abundantes em todas as áreas de coleta. Foram utilizadas amostras dos indivíduos adultos mais velhos(gásteres) e do substrato do ninho de cada colônia. A fim de padronização só foram utilizadas colônias em estágio colonial de pós-emergência, de acordo com os parâmetros estabelecidos por Jeanne (1972).

De cada colônia foram extraídos com auxílio de tesoura para microcirurgia vanna reta e pinça de dissecação anatômica os gásteres de 10 a 15 fêmeas adultas, dependendo do seu número populacional, uma vez que colônias de *M. consimilis* são relativamente pouco numerosas. Foram utilizados os gásteres porque de acordo com Cuvillier-Hot et al. (2001) esta é a parte do corpo em que os hidrocarbonetos estão mais concentrados.

Foram extraídos 5 amostras de 5 regiões distintas dos ninhos. Dos ninhos de *M. consimilis* duas amostras foram de paredes internas das células, duas da parte posterior do ninho e uma do pedúnculo. Dos ninhos de *P. paulista* três amostras foram da parede interna de células de três diferentes camadas, a mais externa, uma intermediária e a mais interna e duas do envelope protetor.

*Análise das relações intra e interespecíficas entre vespas sociais por meio dos compostos químicos do ninho*

Para avaliar as relações interespecíficas foram utilizados amostras dos substratos dos ninhos das espécies *P. paulista*, *P. occidentalis*, *P. versicolor*, *P. ferreri*, *M. consimilis* e *M. latior*. Foram extraídos 5 amostras de 0,5 cm<sup>2</sup> de 5 regiões distintas do ninho. Dos ninhos de *Mischocyttarus* e *Polistes* duas amostras foram de paredes

internas das células, duas da parte posterior do ninho e uma do pedúnculo. Dos ninhos de *Polybia* três amostras foram da parede interna de células de três diferentes camadas, a mais externa, uma intermediária e a mais interna e duas do envelope protetor.

Para avaliar as relações entre as assinaturas químicas dos substratos dos ninhos e do ambiente em que eles se encontravam foram avaliados os ninhos das espécies *P. paulista* e *P. occidentalis*, porque foram espécies coletadas em diferentes tipos de ambientes e pertencentes ao mesmo gênero.

Os ambientes em que foram coletadas as colônias e seus respectivos ninhos foram categorizados da seguinte maneira:

Ambiente de mata: Ambiente com vegetação considerada mais complexa por ocorrer maior abundância e diversidade de árvores de porte relativamente maior do que nos outros ambientes. Nestes locais, o tráfego de pessoas pode ser considerado baixo e as colônias estavam nidificadas na maioria das vezes nas próprias árvores e, em casos de exceção, em beirais de casas no seu entorno.

Rural: Área cujo entorno predominava pastagens e ou monoculturas. Também eram ambientes com pouca movimentação de pessoas e as colônias estavam nidificadas em sua maioria em beirais de propriedades encontradas neste ambiente.

Urbano: Ambiente com predomínio de construções humanas, como casas de madeira ou alvenaria e áreas calçadas com pouca vegetação, no geral, gramíneas e algumas árvores de médio porte. Nestes ambientes, comparativamente aos outros dois havia maior tráfego de pessoas.

#### *Técnica FTIR-PAS*

Cada amostra de operárias e dos substratos dos ninhos foi colocada em estufa a vácuo por no mínimo 48 horas para minimizar a adsorção de umidade, a qual pode

interferir no espectro e, posteriormente foram colocadas na célula fotoacústica do espectrofotômetro para se processar a leitura.

A técnica FTIR-PAS é uma medida da radiação absorvida pela amostra na região espectral do infravermelho médio que compreende de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (Silverstein & Webster, 2000; Skoog et al., 2002), área que abrange a região conhecida como impressão digital (1500 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Esta região é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares, o que possibilita identificar e distinguir radicais moleculares e os tipos de ligações químicas envolvidas nas respectivas amostras (Smith, 1999).

As principais vantagens desta técnica é ser relativamente rápida e não destrutiva (Gordon et al., 1999; Sivakesava & Irudayaraj, 2000), de fácil manuseio, com boa resolução e alta sensibilidade (Skoog et al., 2002). Durante as leituras o espectrofotômetro foi purificado com ar seco para eliminar vapor de água e  $\text{CO}_2$  do interferômetro, e a câmara fotoacústica acoplada com microfone foi purificada com gás Hélio para aumentar a sensibilidade do sistema. O espectro final de cada amostra foi obtido pela média de 64 espectros com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ .

#### *Análises estatísticas*

#### *Análise das relações entre os compostos químicos do substrato do ninho e da cutícula dos adultos*

Para as análises estatísticas foram utilizados valores de absorbância correspondentes a 17 picos em cada espectro analisado no infravermelho médio, que apresentaram, na maioria, vibrações características de compostos formados basicamente por hidrogênio e carbono, além de outros compostos da quitina. Estes picos utilizados já haviam sido definidos por Antonialli-Junior et al. (2007).

Para avaliar a relação entre o perfil químico dos adultos e dos ninhos primeiramente foram elaboradas duas matrizes de similaridade, uma para o perfil químico dos indivíduos adultos e outra para o perfil químico do substrato do ninho. Em seguida, foi realizado teste de mantel para correlacionar as matrizes por meio de distância euclidiana. Sua significância foi definida através de simulação de Monte Carlo (999 permutações) e as análises foram realizadas no programa R, utilizando o pacote *vegan*.

*Análise das relações intra e interespecíficas entre vespas sociais por meio dos compostos químicos do ninho*

Para avaliar as diferenças entre os compostos químicos dos ninhos de cada espécie foi aplicada uma análise de função discriminante, a qual revela o conjunto de variáveis que melhor diferenciam os grupos analisados (Quinn & Keough, 2002). A diferença entre os grupos foi indicada pelo Wilks's Lambda, sendo que valores próximos a zero indicam que os grupos não se sobrepõem, enquanto, valores próximos a um indicam elevada sobreposição entre os grupos e conseqüente inexistência de diferença significativa entre eles.

Para análise das diferenças dos compostos químicos encontrados nos substratos dos ninhos das espécies *P. paulista* e *P. occidentalis* encontrados em diferentes regiões e tipos de ambientes foi aplicado um método de agrupamento, utilizando a distância euclidiana e o método de ligação UPGMA para elaboração de um dendrograma, usando o programa estatístico R. Para avaliar se o dendrograma refletia matriz de similaridade na distribuição dos ninhos utilizou-se o coeficiente de correlação cofenética, sendo definido o valor mínimo de 0,75 como medida de qualidade do ajuste do dendrograma (MacGarigal et al., 2000).

## Resultados

### *Análise das relações entre os compostos químicos do substrato do ninho e da cutícula dos adultos*

O teste de mantel realizado entre as matrizes de similaridade do perfil químico dos indivíduos adultos e do substrato dos ninhos demonstra que há uma relação significativa entre os perfis químicos da cutícula e do ninho tanto para a espécie *P. paulista* ( $r=0,37$ ;  $p=0,05$ ), quanto para *M. consimilis* ( $r=0,40$ ;  $p=0,03$ ).

Na Tabela II estão representados os respectivos número de onda, grupo funcional e modo vibracional dos 17 picos utilizados para as análises estatísticas.

### *Análise das relações intra e interespecíficas entre vespas sociais por meio dos compostos químicos do ninho.*

A inspeção visual entre os espectros médios da composição química dos substratos das diferentes espécies mostra que há diferenças entre elas (Fig. 1). De fato, a análise discriminante sugere que as diferenças visuais são estatisticamente significativas (Wilks' Lambda= 0,050;  $F= 22,858$ ;  $p<0,001$  Fig. 2). A primeira raiz canônica explicou 70,3% dos resultados e a segunda 29,7%, portanto, juntas explicam 100% dos resultados (Fig. 2). A tabela III e Fig. 1 mostram que 12 picos foram mais significativos para separação dos grupos e na sua maioria foram aqueles correspondentes às bandas de hidrocarbonetos.

A análise de similaridade entre colônias provenientes de diferentes ambientes de *P. paulista* e *P. occidentalis* demonstra que, além dos compostos químicos dos ninhos de cada espécie serem distintos, há uma relação entre eles e o tipo de ambiente em que as colônias nidificam (Fig. 3).

## Discussão

Os resultados obtidos sugerem que a composição química do substrato do ninho é semelhante ao perfil químico da cutícula dos adultos de seu respectivo ninho. Além disso, por meio do perfil químico do ninho foi possível separar colônias e espécies de diferentes ambientes de acordo com a similaridade do perfil químico, ou mesmo diferenciar os gêneros analisados.

Espelie & Hermann (1990) e Espelie et al. (1990) também observaram que há similaridade entre os hidrocarbonetos cuticulares presentes no ninho e na cutícula dos adultos de *Polistes annularis* (Viereck) e *Polistes metricus* (Say), sobretudo, aqueles presentes no pedicelo. Contudo, o trabalho de Singer et al. (1992) com *Polistes exclamans* (Viereck) não encontrou correlação entre o perfil de hidrocarbonetos das vespas adultas com de seus ninhos.

De acordo com Espelie et al. (1990), Layton & Espelie (1995) e Gamboa et al. (1996) o contato físico dos indivíduos adultos com o substrato do ninho, sobretudo, no pedicelo é importante porque os adultos adquirem componentes do próprio material do ninho e isso contribui para complementar a composição da assinatura característica da colônia e auxilia no processo de reconhecimento de companheiras de ninho. Portanto, é necessário que o adulto tenha contato com o ninho durante um determinado período para a aquisição do perfil químico da colônia, para que reconheça seu ninho, seus companheiros e também para que seja reconhecido.

Panek et al. (2001) observou que após o terceiro e quarto dia após a emergência, os adultos já adquiriram o perfil químico da colônia e são capazes de reconhecer e serem reconhecidos por seus companheiros de ninho, em parte pelas interações com outros indivíduos e, sobretudo, com o substrato do ninho. Isto foi constatado em *P. metricus*, na qual fêmeas com quatro dias de vida são capazes de identificar seu ninho

natal (Layton & Espelie, 1995). O trabalho de Panek et al. (2001) baseado em experimentos comportamentais foi comprovado pelo de Neves et al. (2012) com *M. consimilis*, no qual os autores investigaram as mudanças químicas ocorridas ao longo dos cinco dias dos indivíduos após emergirem.

A relação entre a assinatura química da cutícula dos adultos com a do substrato do ninho fica evidente em espécies de clima temperado. Nessas espécies, futuras rainhas hibernam durante o inverno e iniciam uma nova colônia apenas na primavera seguinte (Reeve, 1991). Portanto, quando o clima torna-se favorável, estas fêmeas saem de seus hibernáculos em busca de locais propícios para a fundação das novas colônias. Neste sentido, trabalhos como o de Klahn (1979), Reeve (1991), e Sumana et al. (2005) observaram que estas fêmeas retornam ao local de seu sítio natal para realizarem novas fundações, fenômeno conhecido como filopatria.

O perfil químico dos substratos dos ninhos em espécies de Polistinae (Tab. III, Figs. 3 e 4) também são eficientes para inferir relações interespecíficas, diferenciar espécies e, portanto, podem atuar como ferramenta taxonômica. Além disso, a variação desse perfil está relacionada principalmente ao tipo de ambiente, independentemente da área de coleta ou distância geográfica entre as colônias (Fig. 3).

Relações interespecíficas baseadas no perfil de hidrocarbonetos cuticulares foram avaliadas por Jallon & David (1987) em *Drosophila*, Bagnères et al. (1991) em térmitas do gênero *Reticulitermes*, Sutton & Carlson (1993) em larvas de tefritídeos, Elmes et al. (2002) em borboletas do gênero *Myrmica*, Antonialli-Junior et al. (2008) em formigas do gênero *Ectatomma* e Braga et al. (2013) em moscas Sarcophagidae. Contudo, nenhum trabalho com este tema foi realizado, até o momento, com vespas sociais, sobretudo com a composição do substrato do ninho.

A utilidade dos HCs para estabelecer relações interespecíficas já foi explorada em quatro espécies de Sarcophagidae por Braga et al. (2013) que identificaram vários n-alcanos, monometilalcanos e dimetilalcanos na composição da cutícula dos indivíduos, contudo, apenas 5 hidrocarbonetos cuticulares são comuns entre as 4 espécies analisadas, portanto, os autores também concluíram que o perfil de HCs pode ser usado como ferramenta taxonômica. De fato, Schwander et al. (2013) sugerem que mudanças nos perfis de HCs ocorrem em associação com eventos de especiação, sendo importante e eficaz, portanto, para distinguir espécies.

Ainda com relação à composição química dos ninhos deve-se lembrar que em vespas Polistinae, conhecidas como “vespas papel”, a grande maioria dos ninhos é construída com matéria vegetal (West-Eberhard, 1969) que é triturada e misturada com água e secreção salivar, resultando num produto semelhante ao papel (Richards & Richards, 1951). Logo, o perfil químico do ninho e por consequência da população da colônia é influenciado pelo material de construção coletado e pelas secreções das glândulas salivares.

Além disto, várias secreções são depositadas no substrato do ninho para reforçar sua estrutura, especialmente na região do pedicelo (Jeanne, 1970; Turillazzi & Ugolini, 1979; Kojima, 1983). Já foi comprovado, portanto, que secreções de glândulas, como as salivares e de Dufour possuem hidrocarbonetos que são encontrados na cutícula dos adultos (Bagnères & Morgan, 1991; Soroker et al., 1994; Cruz-Landim et al., 2012; Mitra & Gadagkar (in Press)). Portanto, secreções de diversas glândulas podem ser depositadas no ninho, seja durante a construção ou durante interações entre os indivíduos, e conseqüentemente os compostos presentes nessas secreções podem fazer parte do perfil químico do ninho.

Variações populacionais dos perfis de HCs, neste caso, de indivíduos adultos de vespas foram identificadas nos trabalhos de Dapporto et al. (2004a; 2004b) que concluíram que populações mais próximas possuem perfis mais semelhantes, provavelmente pela maior similaridade genética e ambiental. Estes autores apontam o uso do perfil de hidrocarbonetos como uma ferramenta biogeográfica.

Outro fato que deve ser destacado por estes resultados é a confiabilidade da técnica de FTIR-PAS para investigar variações intra e interespecíficas no perfil de HCs, como já havia sido sugerido por Antonialli-Junior et al. (2008).

Portanto, pode-se concluir que os elementos químicos que compõem o substrato do ninho também fazem parte da composição da química da cutícula do adulto, havendo similaridade entre ambos e, que o perfil químico do ninho pode ser utilizado como uma ferramenta complementar para análises de relações intra e interespecíficas em vespas sociais. Além disso, as análises populacionais evidenciam que a variação do perfil químico do substrato dos ninhos entre as espécies está relacionada ao tipo de ambiente em que as colônias nidificam. Por fim, pode-se concluir que a técnica FTIR-PAS mostrou-se eficiente para separação entre os grupos analisados, seja para o perfil químico dos indivíduos adultos como nos trabalhos anteriores quanto para o perfil químico dos ninhos.

## **Agradecimentos**

Agradecemos a Janet W. Reid (JWR Associates) pela revisão do texto em inglês. A CAPES pela bolsa de doutorado à primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade de WFAJ.

## Referências Bibliográficas

- Antonialli-Junior, W.F., Lima, S.M., Andrade, L.H.C. & Suárez, Y.R. (2007). Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 6: 492–499.
- Antonialli-Junior, W.F., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R. & Lima, S.M. (2008). Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 7(2): 559–566.
- Arnold, G., Quenet, B., Cornuet, J.M., Masson, C., Deschepper, B., Estoup, A. & Gasquil, P. (1996). Kin recognition in honeybees. *Nature*, 379: 498.  
DOI:10.1038/379498a0.
- Bagnères, A.G. & Morgan, E.D. (1991). The postpharyngeal glands and the cuticle contain the same characteristic hydrocarbons. *Experientia*, 47: 106–111.
- Bagnères, A.G., Killian, A., Clement, J.L. & Lange, C. (1991). Interspecific recognition among termites of the genus *Reticulitermes*: evidence for a role for the cuticular hydrocarbons. *J. Chem. Ecol.*, 17(12): 2397–2420. DOI10.1007/BF00994590.
- Blomquist, G.J. & Bagnères, A.G. (2010). *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology*. New York: Cambridge University Press.
- Bonavita-Cougourdan, A., Clement, J.L., Lange, C. (1987). Nestmate recognition: the role of cuticular hydrocarbons in the ant *Camponotus vagus* Scop. *J. Entomol. Science*, 22: 1–10.
- Braga, M.V., Pinto, Z.T., Carvalho Queiroz, M.M., Matsumoto, N. & Blomquist, G.J. (2013). Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: Puparial

cases from Sarcophagidae. *Acta Trop.*, 128(3): 479–485. DOI: 10.1016/j.actatropica.2013.07.014.

Breed, M.D., Stiller, T.M. & Moor, M.J. (1988): The ontogeny of kin discrimination cues in the honey bee, *Apis mellifera*. *Behav. Genet.*, 18: 439–448. DOI:10.1007/BF01065513.

Buczkowski, G. & Silverman, J. (2005). Context-dependent nestmate discrimination and the effect of action thresholds on exogenous cue recognition in the Argentine ant. *Anim. Behav.*, 69: 741–749. DOI:10.1016/j.anbehav.2004.06.027.

Cotoneschi, C., Dani, F.R., Cervo, R., Scala, C., Strassmann, J.E., Queller, D.C. & Turillazzi, S. (2009). *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) larvae show different cuticular patterns according to their sex: workers seem not use this chemical information. *Chem. Senses*, 34: 195–202. DOI: 10.1093/chemse/bjn079.

Cruz-Landim, C., Ferreira-Caliman, M.J., Gracioli-Vitti, L.F. & Zucchi, R. (2012). Correlation between mandibular gland secretion and cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Genet. Mol. Res.*, 11(2): 966–977.

Cuvillier-Hot, V., Cobb, M., Malosse, C. & Peeters, C. (2001). Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J. Insect Physiol.*, 47: 485–493.

Dani, F.R., Turillazzi, S. & Morgan, E.D. (1996). Dufour gland secretion of *Polistes* wasp: chemical composition and possible involvement in nestmate recognition (Hymenoptera: Vespidae). *J. Insect Physiol.*, 42: 541–548. DOI.org/10.1016/0022-1910(95)00136-0.

Dapporto, L., Theodora, P., Spacchini, C., Pieraccini, G. & Turillazzi, S. (2004a). Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes*

- dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Soc.*, 51: 279–286. DOI 10.1007/s00040-004-0738-0.
- Dapporto, L., Palagi, E. & Turillazzi, S. (2004b). Cuticular hydrocarbons of *Polistes dominulus* as a biogeographic tool: a study of populations from the Tuscan archipelago and surrounding areas. *J. Chem. Ecol.*, 30: 2139–2151.
- Dapporto, L., Sledge, F.M. & Turillazzi, S. (2005). Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests (Hymenoptera, Vespidae). *J. Insect Physiol.*, 51: 969–973. DOI.org/10.1016/j.jinsphys.2005.04.011.
- Dietermann, V., Peeters, C., Liebig, J., Thivet, V. & Hölldobler, B. (1992). Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 10341-10346. DOI:10.1073/pnas.1834281100.
- Elmes, G.W., Akino, T. & Clarke T.R.T. (2002). Interspecific differences in cuticular hydrocarbon profiles of *Myrmica* ants are sufficiently consistent to explain host specificity by *Maculinea* (large blue) butterflies. *Oecologia*, 130: 525–535. DOI 10.1007/s00442-001-0857-5.
- Espelie, K.E. & Hermann, H.R. (1990). Surface lipids of the social wasp *Polistes annularis* (L.) and its nest and nest pedicel. *J. Chem. Ecol.*, 16(6): 1841–1852.
- Espelie, K.E., Wenzel, J.W. & Chang, G. (1990). Surface lipids of social wasp *Polistes metricus* Say and its nest and nest pedicel and their relation to nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.*, 16(7): 2229–2241.
- Gamboa, G.J. (1996). Kin recognition in social wasps. In S. Turillazzi & M.J. West-Eberhard (Eds.), *Natural history and evolution of paper wasp* (pp. 161–177). Oxford: Oxford University Press.

- Gamboa, G.J., Reeve H.K., Ferguson I.D. & Wacker T.L. (1986a). Nestmate recognition in social wasps: origin and acquisition of recognition odours. *Anim. Behav.*, 34: 685–695. DOI:10.1016/S0003-3472(86)80053-7.
- Gamboa, G.J., Reeve, H.K. & Pfennig, D.W. (1986b). The evolution and ontogeny of nestmate recognition in social wasps. *Annu. Rev. Entomol.*, 31: 431–454. DOI:10.1146/annurev.en.31.010186.002243.
- Gamboa, G.J., Grudzien, T.A., Espelie, K.E. & Bura, E.A. (1996). Kin recognition pheromones in social wasps: Combining chemical and behavioural evidence. *Anim. Behav.*, 51: 625–629.
- Gordon, S.H., Jones, R.W., McClelland, J.F., Wicklow, D.T. & Greene, R.V. (1999). Transient infrared spectroscopy for detection of toxigenic fungi in corn: potential for on-line evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5267–5272. DOI: 10.1021/jf990011f.
- Howard, R.W. & Blomquist, G.J. (1982). Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.*, 27: 149–172. DOI:10.1146/annurev.en.27.010182.001053
- Izzo, A., Wells, M., Huang, Z. & Tibbetts, E. (2010). Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64: 857–874. DOI 10.1007/s00265-010-0902-7.
- Jallon, J.M. & David, J.R. (1987). Variations in cuticular hydrocarbons among the eight species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Evolution*, 41(2): 294–302.
- Jeanne, R.L. (1970). Chemical defense of brood by a social wasp. *Science*, 168: 1465–1466.
- Jeanne, R.L. (1972). Social biology of the Neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 3: 63– 150.

- Kather, R. & Martin, S.J. (2012). Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. *Physiol. Entomol.*, 37, 25–32.  
DOI:10.1111/j.1365-3032.2011.00826.x
- Klahn, J.E. 1979. Philopatric and nonphilopatric foundress associations in the social wasp *Polistes fuscatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 5: 417–424.
- Kojima, J. (1983). Defense of the pre-emergence colony against ants by means of a chemical barrier in *Ropalidia fasciata* (Hymenoptera, Vespidae). *Jpn. J. Ecol.*, 33: 2139–223.
- Layton, J.M., Camann, M.A. & Espelie, K.E. (1994). Cuticular lipids profiles of queens, workers and males of social wasp *Polistes metricus* say are colony-specific. *J. Chem. Ecol.*, 20(9): 2307–2321. DOI 10.1007/BF02033205
- Layton, J.M. & Espelie, K.E. (1995). Effects of nest paper hydrocarbons on nest and nestmate recognition in colonies of *Polistes metricus* Say. *J. Insect Behav.*, 8: 103–113. DOI 10.1007/BF01990972.
- Le Moli, F., Mori, A. & Grasso, D. A. (1992). Nestmate and conspecific non-nestmate recognition in *Formica cunicularia* Latr.: the effect of diet difference. In J. Billen (Ed.) *Biology and evolution of social insects* (pp. 161–165). Leuven, Belgium: Leuven University Press.
- Liang, D. & Silverman, J. (2000). ‘You are what you eat’: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften*, 87: 412–416.
- Lockey, K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89: 595–645. DOI.org/10.1016/0305-0491(88)90305-7.

- Lorenzi, M.C., Bagnères, A.G., Clément, J.L. & Turillazzi, S. (1997). *Polistes biglumis bimaculatus* epicuticular hydrocarbons and nestmate recognition (Hymenoptera, Vespidae). *Insect. Soc.*, 44: 123–138. Doi 10.1007/s000400050035.
- Lorenzi, M.C., Sledge, M.F., Laiolo, P., Sturlini, E. & Turillazzi, S. (2004). Cuticular hydrocarbon dynamics in young adult *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) and the role of linear hydrocarbons in nestmate recognition systems. *J. Insect Physiol.*, 50(10): 935–941.
- MacGarigal, K., Cushman, S.A. & Stafford, S.G. (2000). *Multivariate statistics for Wildlife and Ecology Research*. Nova York: Springer-Verlag.
- Mitra, A. & Gadagkar, R. (in Press). Dufour's gland and cuticle in the social wasp *Ropalidia marginata* contain the same hydrocarbons in similar proportions. *J. Insect Science*.
- Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann. Zool. Fenn.*, 43: 515–530.
- Neves E.F., Andrade L.H.C., Suárez Y.R., Lima S.M. & Antonialli-Junior W.F. (2012). Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genet. Mol. Res.*, 11 (3): 1891-1898.
- Neves, E.F., Montagna, T.S., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R., Lima, S.M. & Antonialli-Junior, W.F. (2013). Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 86(1): 69–77.  
DOI:<http://dx.doi.org/10.2317/JKES1207610.1>.
- Page, R.E.Jr., Metcalf, R.A., Metcalf, R.L., Erickson, E.H.Jr. & Lampman, R.L. (1991). Extractable hydrocarbons and kin recognition in honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Chem. Ecol.*, 17(4): 745–756. DOI 10.1007/BF00994197.

- Panek, L.M., Gamboa G.J., & Espelie, K.E. (2001). The effect of a wasp's age on its cuticular hydrocarbon profile and its tolerance by nestmate and non-nestmate conspecifics (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). *Ethology*, 107: 55–63. DOI:10.1046/j.1439-0310.2001.00633.x.
- Pfennig, D.W., Gamboa, G.J., Reeve, H. K., Shellman-Reeve, J. S. & Ferguson, I. D. (1983). The mechanism of nestmate discrimination in social wasps (*Polistes*, Hymenoptera: Vespidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 13:299–305. DOI 10.1007/BF00299677
- Provost, E., Blight, O., Tirard, A., Renucci, M. (2008). Hydrocarbons and insects' social physiology. In R.P. Maes (Ed.), *Insect Physiology: new research (19–72)*. Nova Science Publishers.
- Quinn, G.P. & Keough, M.J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ratnieks, F.L.W. (1991). The evolution of genetic odor-cue diversity in social hymenoptera. *Am. Nat.*, 137 (2): 202-226.
- Reeve, H.K. (1991): *Polistes*. In K.G. Ross & R.H. Matthews (Eds.), *The Social Biology of Wasps* (pp. 99–148). New York, Ithaca: Cornell University Press.
- Richard, F.J. & Hunt, J.H. (2013). Intracolony chemical communication in social insects. *Insectes Soc.*, 60: 275–291. DOI 10.1007/s00040-013-0306-6.
- Richards, O. W. & M. J. Richards. (1951). Observations on the social wasps of South America (Hymenoptera, Vespidae). *Trans. Entomol. Soc. Lond.*, 102: 1–170. DOI:10.1111/j.1365-2311.1951.tb01241.x.
- Ross, N.M. & Gamboa, G.J. (1981). Nestmate discrimination in social wasps (*Polistes metricus* (Hymenoptera: Vespidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 9: 163–165.

- Schwander, T., Arbuthnott, D., Gries, R., Gries, G., Nosil, P. & Crespi, B.J. (2013). Hydrocarbon divergence and reproductive isolation in *Timema* stick insects. *BMC Evol. Biol.*, 13: 151. DOI:10.1186/1471-2148-13-151.
- Silverstein, R.M. & Webster, F.X. (2000). Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6ª ed. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro.
- Singer, T.L. & Espelie, K.E. (1992). Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. *Anim. Behav.*, 44(1): 63–68. DOI.org/10.1016/S0003-3472(05)80755-9.
- Singer, T.L. & Espelie, K.E. (1997). Exposure to nest paper hydrocarbons is important for nest recognition by a social wasp, *Polistes metricus* Say (Hymenoptera, Vespidae). *Insectes Soc.*, 44: 245–254. DOI 10.1007/s000400050045.
- Singer, T.L., Camann, M.A. & Espelie, K.E. (1992). Discriminant analysis of cuticular hydrocarbons of social wasp *Polistes exclamans* viereck and surface hydrocarbons of its nest paper and pedicel. *J. Chem. Ecol.*, 18(5): 1–13. DOI 10.1007/BF00994615.
- Sivakesava, S. & Irudayaraj, J.J. (2000). Analysis of potato chips using FTIR photoacoustic spectroscopy. *Sci. Food Agric.*, 80: 1805–1810.
- Skoog, D.A., Holler, F.J & Nieman, T.A. (2002). Princípios de Análise Instrumental. 5ª ed. Editora Bookman, Porto Alegre.
- Sledge, M.F., Boscaro, F., Turillazzi, S. (2001). Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49: 401–409. DOI 10.1007/s002650000311.
- Smith, B.C. (1999). Infrared spectral interpretation: A systematic approach. Boca Raton: CRC Press.

Soroker, V., Vienne, C., Nowbahari, E. & Hefetz, A. (1994). The Postpharyngeal gland as a “Gestalt” organ for nestmate recognition in the ant *Cataglyphis niger*.

Naturwissenschaften, 81: 510–513.

Sovari, J., Theodora, P., Turillazzi, S., Hakkarainen, H. & Sundsteöm, L. (2008). Food resources, chemical signaling, and nestmate recognition in the ant *Formica aquilonia*.

Behav. Ecol., 19: 441–447. DOI: 10.1093/beheco/arm160.

Sumana, A., Liebert, A.E., Berry, A.S., Switz, G.T., Orians, C.M. & Starks, P.T. (2005).

Nest hydrocarbons as cues for philopatry in a paper wasp. Ethology, 111: 469–477.

DOI: 10.1111/j.1439-0310.2005.01072.x.

Sutton, B.D. & Carlson, D.A. (1993). Interspecific variation in tephritid fruit fly larvae surface hydrocarbons. Arch. Insect Biochem. Physiol., 23(2): 53–65.

DOI:10.1002/arch.940230202.

Tannure-Nascimento, I.C., Nascimento, F.S., Turatti, I.C., Lopes, N.P., Trigo, J.R. & Zucchi, R. (2007). Colony membership is reflected by variations in cuticular

hydrocarbon profile in a Neotropical paper wasp, *Polistes satan* (Hymenoptera,

Vespidae). Genet. Mol. Res., 6(2): 390–396. DOI: 10.1002/arch.940230202.

Turillazzi, S. & Ugolini, A. (1979). Rubbing behavior in some European *Polistes*

(Hymenoptera: Vespidae). Monit. Zool. Ital., 13: 129–142.

West-Eberhard, M.J. (1969). The social biology of polistine wasps. Misc. Publ. Mus.

Zool. Univ. Mich., 140: 1–110.

**Tabela I.** Espécies, número de colônias e municípios de Mato Grosso do Sul, onde cada espécie foi coletada.

<b>Espécie</b>	<b>Número de colônias</b>	<b>Local de coleta</b>
<i>Polybia paulista</i>	10 colônias	Dourados (5), Ivinhema (3), Mundo Novo (2)
<i>Polybia occidentalis</i>	6 colônias	Dourados (2), Ivinhema (3), Mundo Novo (1)
<i>Mischocyttarus consimilis</i>	10 colônias	Dourados (2), Fátima do Sul (1), Mundo Novo (7)
<i>Mischocyttarus latior</i>	5 colônias	Dourados (3), Mundo Novo (2)
<i>Polistes versicolor</i>	5 colônias	Dourados (2), Mundo Novo (3)
<i>Polistes ferreri</i>	5 colônias	Mundo Novo

**Tabela II.** , Número de onda, grupos funcionais e modo vibracional dos picos identificados nos espectros médios de absorção no infravermelho nas análises da composição química da cutícula de adultos e dos substratos do ninho nas espécies de vespas *Polybia paulista* e *Mischocyttarus consimilis*.

Picos	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional	Modo vibracional
1,2,3	667, 895, 953	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
4,5,6,7	1030, 1076, 1115, 1157	No plano C-H (benzeno)	Dobra
8	1238	-C-N	Estiramento
9	1377	C-CH <sub>3</sub>	Dobra simétrica
10	1450	C-CH <sub>2</sub>	Tesoura
11	1524	N-H	Dobra
12	1651	-C=O	Estiramento
13	2634	-C-N and -N-H	Dobra de sobreposição
14	2877	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Estiramento Simétrico
15	2962	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Estiramento assimétrico
16	3082	N-H	Dobra de sobreposição
17	3290	-N-H	Estiramento

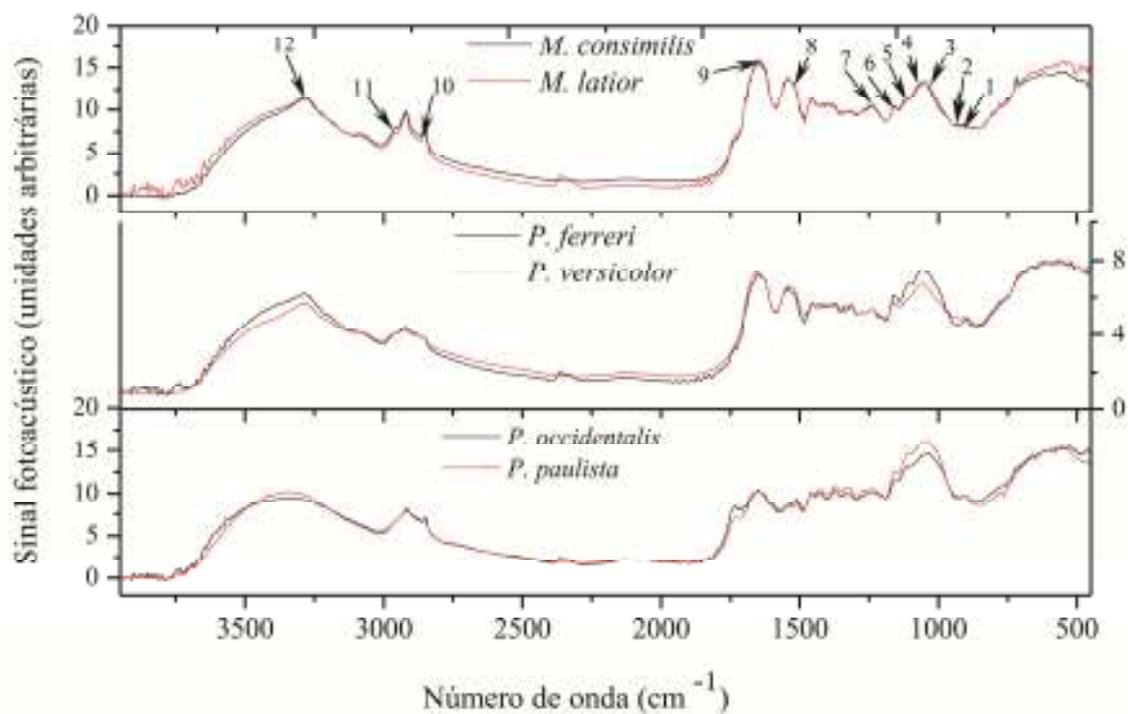
**Tabela III.** Número de onda, valores das raízes canônicas 1 e 2, grupos funcionais e modo vibracional dos 12 picos significativos para separação das espécies nos espectros de absorção no infravermelho, a partir das leituras da composição química dos substratos de seus ninhos.

Picos	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Raiz Canônica 1	Raiz Canônica 2	Grupo Funcional	Modo vibracional
1	895	0,848	2,786	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
2	953	-0,685	-3,127	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
3	1030	2,675	1,767	No plano C-H (benzeno)	Dobra
4	1076	1,272	1,876	No plano C-H (benzeno)	Dobra
5	1115	-3,928	-6,838	No plano C-H (benzeno)	Dobra
6	1157	1,270	6,389	No plano C-H (benzeno)	Dobra
7	1238	-2,298	-2,865	-C-N	Estiramento
8	1523	1,348	1,029	N-H	Dobra
9	1650	0,303	-2,158	-C=O	Estiramento
10	2877	-0,878	-2,367	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Estiramento simétrico
11	2962	2,002	-1,894	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Estiramento assimétrico
12	3290	-1,116	1,496	-N-H	Estiramento

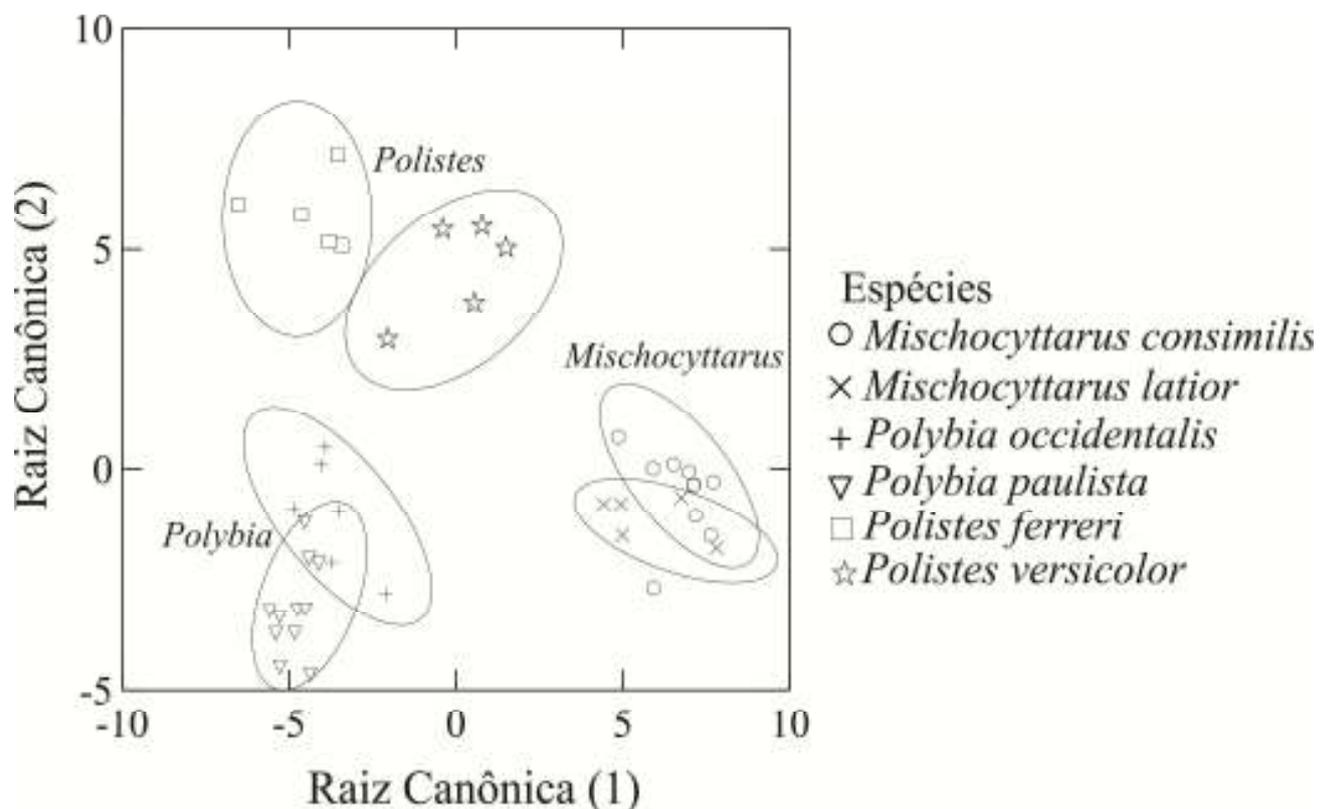
**Fig. 1** Espectros de absorção no infravermelho médio da composição química dos substratos dos ninhos de *Mischocyttarus consimilis*, *Mischocyttarus latior*, *Polistes ferreri*, *Polistes versicolor*, *Polybia occidentalis* e *Polybia paulista* com indicação dos picos mais significativos para a separação dos grupos.

**Fig. 2.** Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante (Wilks' Lambda= 0,000; F= 8,477; p<0,001) mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação entre o perfil de hidrocarbonetos dos ninhos de 6 espécies de Polistinae.

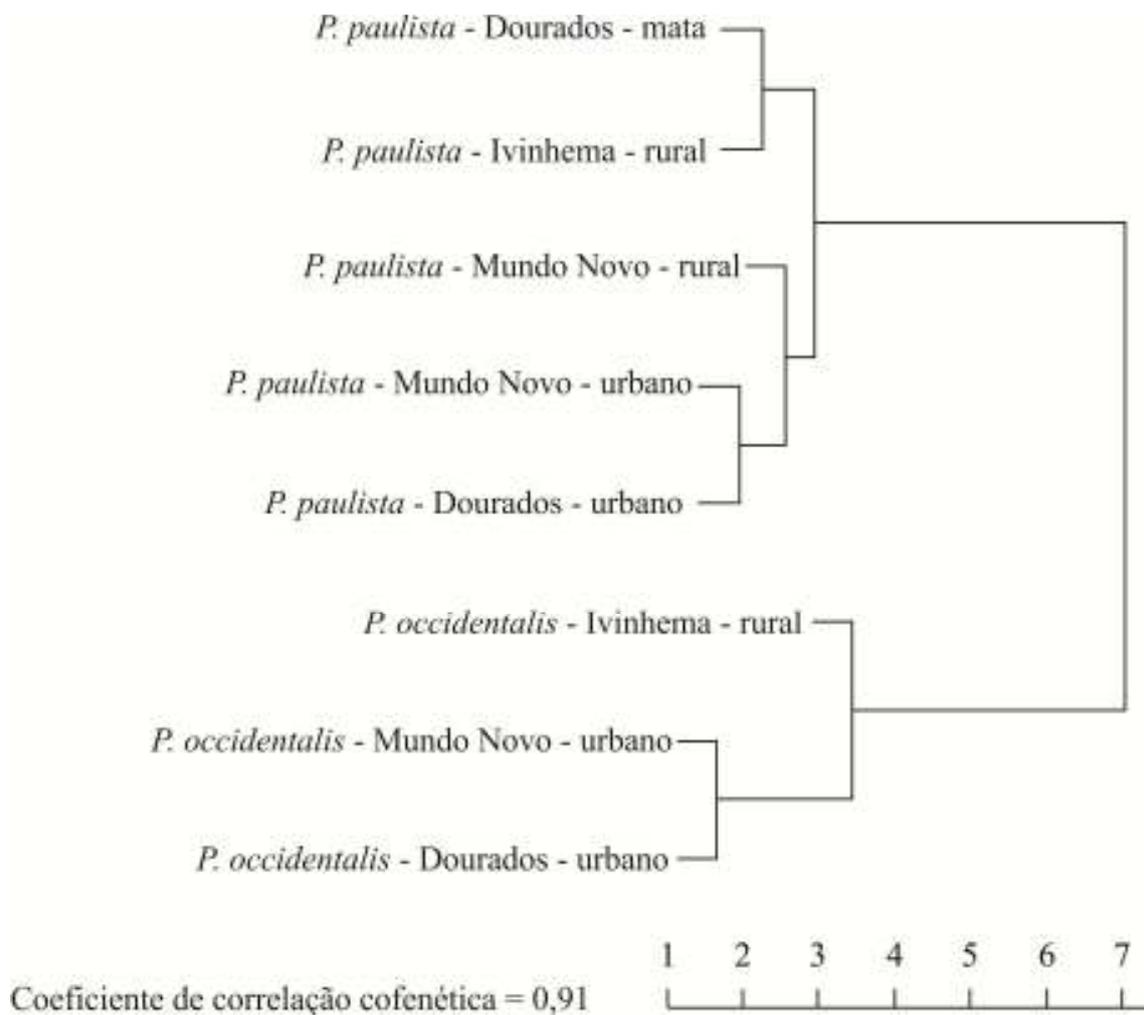
**Fig. 3.** Dendrograma de similaridade baseado na composição química dos substratos dos ninhos das espécies de vespas sociais *Polybia paulista* e *Polybia occidentalis* coletados em diferentes ambientes, nos municípios de Mato Grosso do Sul.



**Fig. 1.** Espectros de absorção no infravermelho médio da composição química dos substratos dos ninhos de *Mischocyttarus consimilis*, *Mischocyttarus latior*, *Polistes ferreri*, *Polistes versicolor*, *Polybia occidentalis* e *Polybia paulista* com indicação dos picos mais significativos para a separação dos grupos.



**Fig. 2.** Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante (Wilks' Lambda= 0,000; F= 8,477; p<0,001) mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação entre o perfil de hidrocarbonetos dos ninhos de 6 espécies de Polistinae.



**Fig. 3.** Dendrograma de similaridade baseado na composição química dos substratos dos ninhos das espécies de vespas sociais *Polybia paulista* e *Polybia occidentalis* coletados em diferentes ambientes, nos municípios de Mato Grosso do Sul.

Viviana de Oliveira Torres

Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970, Dourados-MS, Brazil.

vivianabio@yahoo.com.br

**Status Reprodutivo das Fêmeas na Vespa Eussocial *Polistes ferreri* (Hymenoptera:  
Vespidae)**

VO TORRES<sup>1</sup>, ERP SOARES<sup>1</sup>& WF ANTONIALLI-JUNIOR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul,  
Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul,  
Brasil.

RESUMO: Na subfamília Polistinae o dimorfismo de castas não é acentuado, sendo as diferenças entre as fêmeas, principalmente fisiológicas e comportamentais. Entretanto, apesar destas poucas diferenças existem traços que podem, indicar a posição de cada fêmea e assim mediar as interações entre elas na colônia . Portanto, este trabalho teve por objetivo investigar quais são os fatores que indicam o status reprodutivo de fêmeas *Polistes ferreri* (Saussure, 1853) Foram avaliados os parâmetros morfométricos, desenvolvimento ovariano, ocorrência de inseminação, idade relativa e o perfil químico da cutícula de fêmeas de 09 colônias de *P. ferreri*. As fêmeas apresentaram quatro tipos de desenvolvimento ovariano, desde ovariolos filamentosos até longos e bem desenvolvidos, produzindo vários oócitos. Entretanto, é possível distinguir somente três grupos de fêmeas, de acordo com o perfil químico de sua cutícula: operárias 1, operárias 2 e rainhas, os quais não apresentam diferenças morfológicas significativas. Embora possa ocorrer mais de uma fêmea inseminada na colônia, somente a rainha, que é a mais velha, apresentava o maior grau de desenvolvimento ovariano na colônia.. Nesta espécie, portanto, apesar das fêmeas não diferirem morfológicamente entre si, conseguem, ainda assim identificar a função desempenhada por cada uma por meio de traços, como os compostos químicos da cutícula, que indicam qual sua posição hierárquica na colônia.

Palavras-chave: desenvolvimento ovariano, dominância reprodutiva, hidrocarbonetos cuticulares, morfometria.

**Reproductive Status of females in Eusocial Wasp *Polistes ferreri* (Hymenoptera: Vespidae)**

ABSTRACT: In the subfamily Polistinae, caste dimorphism is not pronounced and the differences among females are primarily physiological and behavioral. This study investigated factors that indicate the reproductive status in females of *Polistes ferreri*. To evaluate the reproductive status we analyzed females from 9 *P. ferreri* colonies and evaluated morphometric parameters, ovarian development, occurrence of insemination, relative age and cuticular chemical profile. The colony females showed four kinds of ovarian development, from filamentous ovarioles to long, well-developed ovarioles, producing several oocytes. However, the discriminant analysis from the cuticular chemical profile showed that it was possible to distinguish only three groups of females: workers 1, workers 2 and queens, that no showed significant morphological differences. The queens were among the older females in the colony and were always inseminated, while the workers age varied according to the stage of colonial development. Therefore, in this species, although the females do not differ morphologically, three groups of females could be distinguished according to the ovarian development degree and the cuticle chemical compounds.

Key words: ovarian development, reproductive dominance, cuticular hydrocarbons, morphometry.

## **Introdução**

A ordem Hymenoptera é um dos grupos mais diversos de insetos, com aproximadamente 130.000 espécies, incluindo abelhas, vespas e formigas. As vespas da família Vespidae são extremamente importantes para o entendimento da origem e evolução do comportamento social em insetos (Markiewicz & O'Donnell, 2001), uma vez que ela inclui desde espécies solitárias, até espécies altamente eussociais (Evans & West-Eberhard, 1970; Wilson, 1971; Carpenter, 1991). Nesta família, a distinção de castas é uma característica evolutiva essencial, uma vez que o grau de socialidade é medido pela diferença entre as castas (Bourke, 1999).

Na Subfamília Stenogastrinae, por exemplo, não ocorre dimorfismo entre as fêmeas, uma vez que rainhas e operárias possuem tamanho similares, sendo as diferenças apenas fisiológicas e comportamentais (Pardi & Piccioli, 1981; Turillazzi, 1991). Em Vespinae, a rainha é maior que as operárias, ou seja, as castas são tipicamente pronunciadas (Spradbery, 1991). Já em Polistinae encontra-se numa condição intermediária se comparada às outras duas subfamílias (Carpenter, 1982), uma vez que exibe desde espécies com castas morfologicamente semelhantes até muito distintas (Richards, 1978; O'Donnell, 1998).

Embora as diferenças de castas em Polistinae sejam menos evidentes do que em Vespinae (Spradbery, 1973), as características morfológicas e comportamentais podem variar bastante entre as espécies (Jeanne, 1980; Jeanne et al., 1995). Basicamente, a determinação de castas pode ser realizada de duas maneiras: pré-imaginal, quando a casta é determinada antes da emergência do indivíduo e geralmente há diferenças morfológicas, comum em espécies mais derivadas (Hunt, 1991; O'Donnell, 1998); ou

pós-imaginal, como ocorre em espécies menos derivadas, nas quais a casta é pelo menos em parte determinada quando adulto e, em geral, a diferença morfológica é pequena ou ausente (Gadagkar, 1991).

Há diversos trabalhos realizados sobre distinção de castas em Polistinae. Da tribo Polistini podemos citar Strassmann et al. (1984) com *Polistes annularis* (Linnaeus) e *Polistes exclamans* (Viereck), Solis and Strassmann (1990) com *P. exclamans*, Dani et al. (1994) com *Polistes gallicus* (Linnaeus), Giannotti and Machado (1999) com *Polistes lanio* (Fabricius), Gobbi et al. (2006) com *Polistes versicolor* (Olivier), Tannure-Nascimento et al. (2008) com *Polistes satan* (Bequaert) e Torres et al. (2009) com *Polistes canadensis canadensis* (Linnaeus), trabalhos que envolveram aspectos comportamentais, desenvolvimento ovariano, morfometria e perfil de hidrocarbonetos cuticulares.

De Mischoctytarini os trabalhos que analisaram determinação, diferenciação e caracterização de castas foram os de Noda et al. (2001), Noda (2005), Torres et al. (2012) e Murakami et al. (2009 e 2013), respectivamente em *Mischoctytarus cerberus styx* (Richards), *Mischoctytarus drewseni* (Saussure), *Mischoctytarus consimilis* (Zikán) e *Mischoctytarus cassununga* (von Ihering), todos envolvendo análises comportamentais.

Na tribo Ropalidiini a espécie mais estudada é *Ropalidia marginata* (Fabricius), cujos trabalhos abrangem desde aspectos comportamentais das castas e comunicação química até determinação e diferenciação de castas (Gadagkar & Joshi, 1983; Gadagkar et al., 1991; Premnath et al., 1996; Gadagkar, 2001; Mitra et al., 2011; Mitra & Gadagkar, 2012). Outros trabalhos que investigaram a divisão de trabalho nesta tribo foram realizados com *Ropalidia rufoplagiata* (Cameron) (Sinha et al., 1993) e *Ropalidia romandi* (Le Guillou) (Fukuda et al., 2003).

Outro fator importante para o estabelecimento e manutenção da dominância reprodutiva na colônia é a capacidade de reconhecimento entre os indivíduos da colônia (Ferreira-Caliman et al., 2007). Dentre estes, a comunicação por meio de compostos químicos é o mecanismo mais usado em colônias de vespas sociais, bem como em outros insetos sociais (Matthews & Matthews, 2010; Blomquist & Bagnères, 2010). Os compostos envolvidos neste tipo de comunicação são atuantes no reconhecimento intra e interespecíficos e são denominados de hidrocarbonetos cuticulares (HCs) (Monnin, 2006; Blomquist & Bagnères, 2010).

Estes compostos são parte constituinte da camada lipídica que recobre a cutícula dos insetos, os quais atuam para evitar a dessecação (Lockey, 1988) e criam uma barreira contra microorganismos (Provost et al., 2008). Além disso, atualmente sabe-se que estes HCs atuam como feromônios de contato na identificação de co-específicos, na manutenção da hierárquica colonial e identificação do status fisiológico (Monnin, 2006; Provost et al., 2008), atuando, portanto, como uma assinatura química específica do indivíduo.

Diversos estudos demonstram que, de fato, estes HCs são importantes para distinção intra e interespecífica em insetos sociais, atuando desde o reconhecimento do papel dos indivíduos dentro da colônia, status reprodutivo, fertilidade, hierarquia de dominância, idade até a distinção de diferentes colônias (Layton et al., 1994; Sledge et al., 2001; Dapporto et al., 2004; Dapporto et al., 2005; Monnin, 2006; Antonialli-Junior et al., 2007; Tannure-Nascimento et al., 2008; Cotoneschi et al., 2009; Izzo et al., 2010; Neves et al., 2012).

Além disso, a relação entre o status reprodutivo e o perfil de hidrocarbonetos cuticulares nos insetos sociais é importante para o estabelecimento e reconhecimento de uma dominância reprodutiva (Monnin, 2006), especialmente em colônias de espécies de

fundação independente como é o caso do gênero *Polistes*. Neste gênero acreditava-se que a rainha mantinha seus status reprodutivo usando somente de agressividade para com as demais fêmeas, contudo, nas últimas décadas estudos vêm demonstrando a importância e o papel dos hidrocarbonetos cuticulares na comunicação entre membros das colônias e, como mediador na manutenção do status da rainha (Bonavita-Cougourdan et al., 1991; Sledge et al., 2001; Dapporto et al., 2005).

A espécie *Polistes ferreri* (Saussure, 1853) é uma vespa eussocial neotropical, encontrada no Brasil, Argentina, Uruguai e Bolívia (Richards, 1978) e os estudos com esta espécie estão relacionados à atividade forrageadora (Andrade & Prezoto, 2001; De Souza et al., 2008), ao papel do machos na colônia (Sinzato et al., 2003), a relação de dominância na colônia (Tannure & Nascimento, 1999; De Souza et al., 2010) e a caracterização do ciclo colonial, estratégias de fundação e de utilização/reutilização das células no favo (Sinzato et al., 2011).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar fatores fisiológicos, morfológicos e químico que podem indicar o status reprodutivo das fêmeas nas colônias da vespa social *Polistes ferreri* (Saussure).

### **Material e Métodos**

Foram coletadas de abril de 2011 a março de 2012 nove colônias de *P. ferreri*, sendo avaliadas no total, 90 fêmeas. Três colônias estavam no estágio de pré-emergência, cinco em pós-emergência (pré-macho) e uma em pós-emergência (pós-macho), de acordo com a classificação proposta por Jeanne (1972).

Após a coleta das colônias o gáster de cada fêmea foi fixado individualmente em eppendorf contendo álcool etílico absoluto (P.A. 99.8%) para análise de sua condição ovariana, inseminação e idade relativa. O restante do corpo foi preservado por

congelamento, para análise dos parâmetros morfométricos e do perfil químico da cutícula.

Foram realizadas, em cada fêmea, as seguintes medidas morfométricas: Cabeça: largura da cabeça (LC) e distância interorbital mínima (DIm); Mesossoma: largura do mesoscuto (LM), comprimento do mesoscuto (CM) e altura do mesoscuto (AM); Metassoma: largura basal do II tergito (LbIter), largura apical do II tergito (LaIter) e comprimento do II tergito (CIIter); Asa: comprimento parcial da asa anterior (CA). As medidas foram modificadas a partir de Shima et al. (1994) e Noll et al. (1997).

Os gásteres foram dissecados sob estereomicroscópio binocular Zeiss para avaliação do grau de desenvolvimento ovariano, inseminação e idade relativa. Os ovários foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento dos ovariolos, baseando-se nas observações de Baio et al. (2004). A inseminação foi determinada pela coloração da spermateca, que assume uma coloração opaca ou perolizada quando contém espermatozoides (Shima et al., 1994; Noda et al., 2003).

A idade relativa foi determinada de acordo com a pigmentação progressiva do apódema transverso: AC (amarelo claro), MC (marrom claro), ME (marrom escuro) e P (preto). Segundo Richards (1971) e West-Eberhard (1973) esta sequência de cores indica uma progressão na idade dos indivíduos.

Para análise do perfil químico da cutícula, o tórax de cada fêmea foi submetido à técnica de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS). Contudo, antes permaneceram em estufa a vácuo por no mínimo 48 horas para minimizar a adsorção de umidade. Esta técnica foi utilizada por Antonialli-Junior et al. (2007; 2008) e Neves et al. (2012 e 2013) no estudo do perfil de HCs, a qual tem se mostrado confiável para avaliar perfis de HCs em formigas e vespas.

A técnica FTIR-PAS mede a radiação absorvida pela amostra, no caso dos tórax de cada fêmea. Foi utilizada a região espectral do infravermelho médio, que compreende de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Dessa forma, foi possível identificar e distinguir radicais moleculares e ligações químicas nas respectivas amostras.

Para as análises estatísticas foram utilizados valores de absorbância correspondentes de 17 picos de cada espectro de absorção, os quais representam compostos da cutícula, principalmente de hidrocarbonetos cuticulares. Estes picos foram definidos por Antonialli-Junior et al., (2007) e estão listados na Tabela I, juntamente com seus respectivos número de onda, grupo funcional e modo vibracional.

Para discriminar grupos definidos entre as fêmeas, os dados de desenvolvimento ovariano, morfometria e perfil químico cuticular, foram submetidos a análises de função discriminantes, que revelam os grupos de variáveis que melhor explicam os grupos analisados, indicado pelo valor do Wilk's Lambda (Quinn & Keough, 2002). As análises foram realizadas no software Systat 12 e a variável foi considerada significativa quando o nível atingido foi  $< 0.05$ .

## **Resultados**

Foram encontrados quatro graus de desenvolvimento ovariano entre as fêmeas de colônias de *P. ferrerii* em diferentes estágios coloniais: tipo A, ovários filamentosos, sem oócitos visíveis; tipo B, ovários contendo alguns oócitos em início de desenvolvimento; tipo C, ovários apresentando oócitos moderadamente desenvolvidos e alguns em fase final de vitelogênese; tipo D, ovários longos e bem desenvolvidos, cada um contendo dois ou mais oócitos maduros (Fig. 1).

Ovários do tipo A foram encontrados em 33,33% das fêmeas, do tipo B em 45,55%, do tipo C em 12,22% e D em 10% das fêmeas. Em 77,80% das colônias havia

apenas uma fêmea inseminada (Fig. 2), com exceção às colônias 04 e 05, nas quais havia quatro e duas fêmeas inseminadas, respectivamente. No entanto, apenas uma fêmea em cada colônia, apresentava condição ovariana típica de uma poedeira (Fig. 1D).

A partir dos espectros analisados por FTIR-PAS foram elaborados espectros médios para cada grupo de fêmea (operárias 1, operárias 2 e rainha), os quais apresentaram 11 picos significativos para a separação dos grupos (Fig. 3 e tabela I). Estes picos correspondem a grupos funcionais de compostos formados principalmente por HCs além de compostos da quitina (Tabela I). A primeira raiz canônica explicou 78% dos resultados e a segunda 22%, portanto, juntas explicam 100% dos resultados.

A figura 3, portanto, mostra que é possível identificar 3 grupos de fêmeas, por meio dos compostos químicos da cutícula: a) Operárias 1: fêmeas com ovários filamentosos do tipo A; b) Operárias 2: fêmeas com ovários parcialmente desenvolvidos, do tipo B e C; e c) Rainhas: fêmeas com ovários completamente desenvolvidos do tipo D. Estes grupos são, de fato, estatisticamente distintos, de acordo com a análise discriminante (Wilks' Lambda= 0,045; F= 11,722; p<0,001).

Por outro lado, submetendo os parâmetros morfométricos a uma análise discriminante (Wilks' Lambda= 0,757; F= 4,086; p<0,001) não foram encontradas diferenças significativas entre estes 3 grupos de fêmeas. Apesar do valor de p ser significativo o valor de Wilks' Lambda mostra que há muita sobreposição entre as amostras analisadas, além disso, o pequeno valor de p é atribuído ao grande número amostral.

Com relação á idade relativa, no estágio de pré-emergência e pós-emergência há predominância de fêmeas mais velhas, cujo padrão de coloração do apódema é escuro (Fig. 4). No entanto, nas colônias em pós-emergência (pós-macho) o predomínio foi de

fêmeas mais jovens (Fig. 4). As rainhas sempre eram fêmeas com apódemas de coloração marrom escuro ou preto, portanto, estando sempre entre as fêmeas mais velhas da colônia.

### **Discussão**

Os resultados demonstram que as colônias de *P. ferreri* possuem fêmeas morfológicamente similares com quatro condições de desenvolvimento ovariano. Contudo, a análise do perfil químico da cutícula identifica apenas três grupos de fêmeas distintos.

Estudos conduzidos por Giannotti and Machado (1999), Gobbi et al. (2006) e Murakami et al. (2009) analisaram a morfologia e fisiologia em espécies de fundação independente, respectivamente *P. lanio*, *P. versicolor* e *M. cassununga* e encontraram 3, 5 e 5 graus de desenvolvimento ovariano, respectivamente. Sinha et al. (1993), Giannotti and Machado (1999) e Murakami et al. (2009) não encontraram diferenças morfológicas entre fêmeas de *R. rufoplagiata*, *P. lanio* e *M. cassununga*.

A ausência de diferenças morfológicas significativas entre fêmeas, de fato, é uma característica comum em espécies de fundação independente (Jeanne, 1986; Keeping, 2000). Entretanto, estudos realizados por Fukuda et al. (2003), Tannure-Nascimento et al. (2005), Murakami and Shima (2006) e Gobbi et al. (2006) descreveram que as diferenças no tamanho corporal e/ou no status fisiológico pode ser correlacionado com a condição reprodutiva da fêmea. Gobbi et al. (2006), por exemplo, observou que fêmeas de *P. versicolor* em agregados são maiores do que fundadoras, operárias e rainhas. De acordo com estes autores, mudanças ambientais podem levar à produção de fêmeas maiores, capazes de sobreviver a temperaturas mais rigorosas e fundar novas colônias posteriormente, como observado em vespas *Polistes* de clima

temperado (West-Eberhard, 1969; Solis & Strassmann, 1990; Dani, 1994). A existência de pouca diferenciação morfológica entre as castas também é uma característica comum em alguns gêneros de Epiponini tais como *Protopolybia*, *Parachartergus*, *Pseudopolybia*, *Polybia*, *Angiopolybia*, *Chartergellus* e *Brachygastra* (Mateus et al., 2004; Noll et al., 2004).

Por outro lado, em espécies com fêmeas morfológicamente similares, as castas podem ser distinguidas principalmente a nível comportamental, no qual indivíduos dominantes se especializam em determinadas tarefas, enquanto indivíduos subordinados se especializam em outros (Jeanne, 1986). Portanto, o status é determinado principalmente durante o estágio adulto, como indicado por Gelin et al. (2008) em *Angiopolybia pallens* (Lepeletier) e por O'Donnell (1998) em espécies de *Polistes*. Contudo, estudos conduzidos por Gadagkar et al. (1991) com *R. marginata*, Keeping (2002) com *Belonogaster petiolata* (DeGeer), Dapporto et al. (2011) com *P. gallicus* e Hunt et al. (2011) com *Polistes dominula* (Christ), demonstraram que, ao menos em parte, a determinação de castas pode ser pré-imaginal.

A presença de apenas uma fêmea inseminada com ovário do tipo D em 77,80% das colônias sugere a ocorrência de monoginia funcional, padrão comum a vespas deste grupo (Jeanne, 1972; West-Eberhard, 1978a). Contudo, outras fêmeas inseminadas podem ocorrer na colônia e, provavelmente estariam aptas a substituir a rainha, uma característica comum em espécies eussociais de fundação independente (Murakami & Shima, 2006). Dessa forma, a diferença entre fêmeas reprodutivas e não reprodutivas é flexível e complexa, dependendo de aspectos fisiológicos, comportamentais e ecológicos (Murakami & Shima, 2006). Segundo Murakami et al. (2009) esta estratégia pode, ainda, minimizar os efeitos de predação e parasitismo, como foi observado em *M. cassununga*.

A análise do perfil químico da cutícula revelou três grupos de fêmeas: operárias 1, operárias 2 e rainhas. Isto comprova que não só os parâmetros fisiológicos, mas também os compostos da cutícula são importantes para o reconhecimento do status reprodutivo das fêmeas. De acordo com Monnin (2006) esta relação entre o status reprodutivo e o perfil de HCs é importante para o estabelecimento e reconhecimento da posição hierárquica, principalmente em espécies com fundação independente. Sledge et al. (2001), de fato, encontraram diferenças entre os perfis de HCs de fêmeas alfas, subordinadas e operárias em colônias de *P. dominula* após a emergência das primeiras operárias na colônia. Além disso, esses autores observaram que a remoção da fêmea alfa leva a sua substituição e que a nova fêmea ao assumir sua posição adquire um perfil de hidrocarbonetos cuticulares semelhante ao seu.

Outros trabalhos que demonstraram a importância do perfil de HCs para mediar as interações durante o estabelecimento da hierarquia em colônias de vespas sociais foram realizados por Tannure-Nascimento et al. (2008) com *P. satan*, Dapporto et al. (2005) com *P. dominula* e Bonckaert et al. (2012) com *Vespula vulgaris* (Linnaeus). Bonckaert et al. (2012) ao analisar colônias de *V. vulgaris* observaram que rainhas poedeiras, rainhas de agregados, rainhas virgens e operárias apresentavam diferentes graus de desenvolvimento ovariano e que estes correspondiam à diferentes perfis de HCs.

A ocorrência de fêmeas intermediárias com ovários parcialmente desenvolvidos, chamadas de intermediárias, foi relatada primeiramente por Richards and Richards (1951), demonstrando uma complexidade no estabelecimento da hierarquia e, portanto, do papel da fêmea na colônia. Alguns autores, como Richards (1971) afirmam que o papel de intermediárias é a produção de ovos tróficos ou machos, contudo, West-Eberhard (1978b) e Gastreich et al. (1993) consideram-nas como possíveis jovens

rainhas não inseminadas. De qualquer forma, o grau de desenvolvimento ovariano aliado à ocorrência ou não de inseminação, torna mais evidente a posição da fêmea na hierarquia.

As colônias apresentam durante todo o ciclo colonial, a exceção do estágio de pós-emergência (pós-macho) fêmeas mais velhas. Além disso, como já relatado por Baio et al. (2003), Murakami et al. (2009) e Felippotti et al. (2010), investigando colônias de *M. docilis* (Richards), *M. cassununga* e três espécies de *Clypearia*, respectivamente, que as rainhas estão entre as fêmeas mais velhas da colônia. Murakami et al. (2009) observou ainda que fêmeas de *M. cassununga* com maior grau de desenvolvimento ovariano são as mais velhas e mais agressivas no ranking hierárquico. Os resultados sugerem, portanto, o sistema de gerontocracia (Strassmann & Meyer, 1983), comum em espécies de fundação independente, no qual à medida que as fêmeas envelhecem são mais agredidas, uma vez que ameaçam a posição da rainha.

Pode-se concluir, portanto, que em *P. ferreri* há três grupos de fêmeas que apresentam diferentes perfis químicos cuticulares. O primeiro grupo é de fêmeas com ovariolos filamentosos, típico de operárias; o segundo, fêmeas com ovariolos parcialmente desenvolvidos; e o terceiro é o grupo das rainhas, as quais estão entre as fêmeas mais velhas, são inseminadas e apresentam maior grau de desenvolvimento ovariano entre todas as fêmeas. Por outro lado, não houve diferenças morfológicas significativas entre estes grupos de fêmeas. Dessa forma, apesar de não haver diferenças morfológicas, outros fatores tais como a composição química da cutícula, a inseminação e idade relativa atuam como indicativo da condição fisiológica reprodutiva das fêmeas na colônia.

### **Agradecimentos.**

Agradecemos ao Prof. Dr. Orlando Tobias Silveira (Museu Paraense Emílio Goeldi) pela identificação da espécie e Janet W. Reid (JWR Associates) pela revisão do texto em inglês. A CAPES pelo fornecimento de bolsa de doutorado à primeira autora e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade de WFAJ.

## Referências

- Andrade, F.R. & Prezoto, F. (2001). Horários de atividade forrageadora e material coletado por *Polistes ferreri* Saussure, 1853 (Hymenoptera, Vespidae), nas diferentes fases de seu ciclo biológico. *Rev. Bras. Zooc.*, 3: 117–128.
- Antonialli-junior, W.F., Lima, S.M., Andrade, L.H.C. & Suárez, Y.R. (2007). Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 6: 492–499.
- Antonialli-Junior, W.F., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R. & Lima, S.M. (2008). Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 7(2): 559–566.
- Bagnères, A.G. & Blomquist, G.J. (2010). Site of synthesis, mechanism of transport and selective deposition of hydrocarbons. In G.J. Blomquist & A.G. Bagnères (Eds.), *Insect hydrocarbons: biology, biochemistry and chemical ecology* (pp. 75–99). Cambridge, New York: Cambridge University Press.
- Baio, M.V., Noll, F.B. & Zucchi, R. (2003). Shape differences rather than size differences between castes in the Neotropical swarm-founding wasp *Metapolybia docilis* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *BMC Evol. Biol.*, 3: 1–9.  
DOI:10.1186/1471-2148-3-10.
- Baio, M.V., Noll, F.B. & Zucchi, R. (2004). Morphological caste differences, variation according to colony cycle, and non-sterility of workers in *Brachygastra augusti* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini), a Neotropical swarm-founding wasp. *J. N. Y. Entomol. Soc.*, 111(4): 243–253.

Bonavita-Cougourdan, A., Theraulaz, G., Bagnères, A.G., Roux, M., Pratte, M., Provost, E. & Clément, J.L. (1991). Cuticular hydrocarbons, social organization and ovarian development in a polistine wasp: *Polistes dominulus* Christ. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100: 667–680. DOI: [org/10.1016/0305-0491\(91\)90272-F](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90272-F).

Bonckaert, W., Drijfhout, F.P., D’Ettorre, P., Billen J. & Wenseleers, T. (2012). Hydrocarbon signatures of egg maternity, caste membership and reproductive status in the common wasp. *J. Chem. Ecol.*, 38(1): 42–51. DOI: [10.1007/s10886-011-0055-9](https://doi.org/10.1007/s10886-011-0055-9).

Bourke, A.F.G. (1999). Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. *J. Evolution. Biol.*, 12(2): 245–257. DOI: [10.1046/j.1420-9101.1999.00028.x](https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1999.00028.x).

Carpenter, J.M. (1982). The phylogenetic relationships and natural classification of the Vespoidea (Hymenoptera). *Syst. Entomol.*, 7: 11–38.

Carpenter, J.M. (1991). Phylogenetic relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds.), *The social biology of wasps* (pp. 7–32). Ithaca, New York: Cornell University Press.

Cotoneschi, C., Dani, F.R., Cervo, R., Scala, C., Strassmann, J.E., Queller, D.C. & Turillazzi, S. (2009). *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae) larvae show different cuticular patterns according to their sex: workers seem not use this chemical information. *Chem. Senses.*, 34: 195–202. DOI: [10.1093/chemse/bjn079](https://doi.org/10.1093/chemse/bjn079).

Dani, F.R. (1994). Caste size differences in *Polistes gallicus* (L) (Hymenoptera, Vespidae). *Ethol. Ecol. Evol.*, 3: 67–73.

Dapporto, L., Theodora, P., Spacchini, C., Pieraccini, G. & Turillazzi, S. (2004). Rank and epicuticular hydrocarbons in different populations of the paper wasp *Polistes dominulus* (Christ) (Hymenoptera, Vespidae). *Insect. Soc.*, 51: 279–286. DOI [10.1007/s00040-004-0738-0](https://doi.org/10.1007/s00040-004-0738-0).

Dapporto, L., Sledge, F.M. & Turillazzi, S. (2005). Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests (Hymenoptera, Vespidae). *J. Insect Physiol.*, 51(3): 969–973. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2005.04.011.

Dapporto, L., Petrocelli, I. & Turillazzi, S. (2011). Incipient morphological caste in *Polistes gallicus* (Vespidae, Hymenoptera). *Zoomorphology*, 130: 197–201. DOI: 10.1007/s00435-011-0130-3.

De Souza, A.R., Rodrigues, I.L., Rocha, J.V.A., Reis, W.A.A., Lopes, J.F.S. & Prezoto, F. (2008). Foraging behavior and dominance hierarchy in colonies of the Neotropical social wasp *Polistes ferreri* Saussure, 1853 (Hymenoptera, Vespidae) in different stages of development. *Sociobiology*, 52: 293–303.

De Souza, A.R., Rocha, J.V.A., Rodrigues, I.L., & Prezoto, F. (2010) Dominance interactions among females of the Neotropical eusocial wasp *Polistes ferreri* Saussure, 1853 (Hymenoptera: Vespidae). *Sociobiology*, 55: 547–555.

Evans, H.E. & West-Eberhard, M.J. (1970). *The wasps*. Ann Arbor: University of Michigan Press.

Felippotti, G.T., Mateus, L., Mateus, S., Noll, F.B. & Zucchi, R. (2010). Morphological caste differences in three species of the Neotropical genus *Chypearia* (Hymenoptera: Polistinae: Epiponini). *Psyche: A. J. Entomol.*, 1–8. DOI:org/10.1155/2010/410280

Ferreira-Caliman, M.J., Cabral, G.C.P., Mateus, S., Turatti, I.C.C., Nascimento, F.S. & Zucchi, R. (2007). Composição química da epicutícula de 77 operárias de *Melipona marginata* (Hymenoptera, apinae, meliponini). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*: 1–2.

Fukuda, H., Kojima, J. & Jeanne, R.L. (2003). Colony specific morphological caste differences in an Old World, swarm-founding polistine, *Ropalidia romandi*

(Hymenoptera: Vespidae). Entomol. Sci., 6: 37–47. DOI: 10.1046/j.1343-8786.2003.00002.x.

Gadagkar, R. & Joshi, N.V. (1983). Quantitative ethology of social wasps: Time-activity budgets and caste differentiation in *Ropalidia marginata* (Lep.) (Hymenoptera: Vespidae). Anim. Behav., 31: 26–31.

Gadagkar, R. (1991). *Belonogaster*, *Mischocyttarus*, *Parapolybia*, and independent founding *Ropalidia*. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds.), The social biology of wasps (pp. 149–190). Ithaca, New York: Cornell University Press.

Gadagkar, R. (2001). Division of labour and organization of work in the primitively eusocial wasp *Ropalidia marginata*. P. Indian Nat. Sci. Acad., B67: 397–422.

Gadagkar, R., Bhagavan, S., Chandrashekara, & Vinutha, C. (1991). The role of larval nutrition in pre-imaginal biasing of caste in the primitively eusocial wasp *Ropalidia marginata* (Hymenoptera: Vespidae). Ecol. Entomol., 16: 435–440. DOI: 10.1111/j.1365-2311.1991.tb00236.x.

Gastreich, K.R., Strassmann, J. E. & Queller, D.C. (1993). Determinants of high genetic relatedness in the swarm-founding wasp, *Protopolybia exigua*. Ethol. Ecol. Evol., 5: 529–539.

Gelin, L.F.F., Cruz, J.D., Noll, F.B., Giannotti, E., Santos, G.M.M. & Bichara-Filho, C.C. (2008). Morphological caste studies in the Neotropical warm-founding Polistinae wasp *Angiopolybia pallens* (Lepeletier) (Hymenoptera: Vespidae). Neotrop. Entomol., 37(6): 691–701.

Giannotti, E., & Machado, V.L.L. (1999). Behavioral castes in the primitively eusocial wasp *Polistes lanio* Fabricius (Hymenoptera: Vespidae). Rev. Bras. Entomol., 43: 185–190.

Gobbi, N., Noll, F.B. & Penna, M.A.H. (2006). “Winter” aggregations, colony cycle, and seasonal phenotypic change in the paper wasp *Polistes versicolor* in subtropical Brazil. *Naturwissenschaften*, 93(10): 487–494.

Hunt, J.H. (1991). Nourishment and the evolution of the Social Vespidae. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds.), *The social biology of wasps* (pp. 426–450). Ithaca, New York: Cornell University Press.

Hunt, J.H., Mutti, N.S., Havukainen, H., Henshaw, M.T. & Amdam, G.V. (2011). Development of an RNA Interference Tool, Characterization of Its Target, and an Ecological Test of Caste Differentiation in the Eusocial Wasp *Polistes*. *PLoS ONE*, 6(11): e26641. DOI:10.1371/journal.pone.0026641.

Izzo, A., Wells, M., Huang, Z. & Tibbetts, E. (2010). Cuticular hydrocarbons correlate with fertility, not dominance, in a paper wasp, *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64: 857–874. DOI 10.1007/s00265-010-0902-7.

Jeanne, R.L. (1972). Social biology of the Neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 3: 63–150.

Jeanne, R.L. (1980). Evolution of social behavior in Vespidae. *Annu. Rev. Entomol.*, 25: 371–395.

Jeanne, R.L. (1986). The evolution of the organization of work in social insects. *Monit. Zool. Ital.*, 20: 119–133.

Jeanne, R.L., Graf C.A. & Yandell, B. S. (1995). Non-size-based morphological castes in a social insect. *Naturwissenschaften*, 82: 296–298.

Keeping, M. G. (2000). Morphological physiological variability and differentiation of reproductive roles among foundresses of the primitively eusocial wasp *Belongaster petiolata* (Deeger) (Hymenoptera: Vespidae). *Insect. Soc.*, 47: 147–154. Doi:10.1007/PL00001693.

Layton, J.M., Camann, M.A. & Espelie, K.E. (1994). Cuticular lipids profiles of queens, workers and males of social wasp *Polistes metricus* say are colony-specific. *J. Chem. Ecol.*, 20(9): 2307–2321. DOI: 10.1007/BF02033205.

Lockey, K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89: 595 – 645. DOI.org/10.1016/0305-0491(88)90305-7.

Markiewicz, D.A. & O'Donnell, S. (2001). Social dominance, task performance and nutrition: implications for reproduction in eusocial wasps. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.*, 187: 327–333.

Mateus, S., Noll F.B. & Zucchi, R. (2004). Caste flexibility and variation according to the colony cycle in the swarm-founding wasp, *Parachartergus fraternus* (Gribodo) (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae). *J. Kans. Entomol. Soc.*, 77(4): 470–483.

Matthews, R.W. & Matthews, J.R. (2010). *Insect behavior*. New York: Springer.

Mitra, A. & Gadagkar, R. (2012). Road to royalty – Transition of potential queen to queen in the primitively Eusocial wasp *Ropalidia marginata*. *Ethology*, 118: 694–702. DOI: 10.1111/j.1439-0310.2012.02059.x.

Mitra, A., Saha, P., Elihu, C., Bhadra, A. & Gadagkar, R. (2011). Communication in *Ropalidia marginata*: Dufour's gland contains queen signal that is perceived across colonies and does not contain colony signal. *J. Insect Physiol.*, 57: 280–284. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.11.014.

Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann. Zool. Fenn.*, 43: 515–530.

Murakami, A.S.N. & Shima, S.N. (2006). Nutritional and social hierarchy establishment of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cassununga*

(Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini) and related aspects. *Sociobiology*, 48(1): 183–207.

Murakami, A.S.N., Shima, S.N. & Desuó, I.C. (2009). More than one inseminated female in colonies of the independent-founding wasp *Mischocyttarus cassununga* von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). *Rev. Bras. Entomol.*, 53(4): 653–662. DOI:org/10.1590/S0085-56262009000400017.

Murakami, A.S.N., Desuó, I.C., Shima, S.N. (2013). Division of labor in stable social hierarchy of the independent-founding wasp *Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga*, Von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology*, 60(1): 114–122. DOI: 10.13102/sociobiology.v60i1.114-122.

Neves, E.F., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R., Lima, S.M. & Antonialli-Junior, W.F. (2012). Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genet. Mol. Res.*, 11 (3): 1891-1898. DOI:10.4238/2012.July.19.8.

Neves, E.F., Montagna, T.S., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R., Lima S.M. & Antonialli-Junior, W.F. (2013). Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 86(1): 69–77. DOI: <http://dx.doi.org/10.2317/JKES1207610.1>.

Noda, S.C.M. (2005). Determinação e diferenciação de castas em *Mischocyttarus (Mischocyttarus) drewseni* Saussure, 1857 (Hymenoptera, Vespidae) de acordo com a perspectiva nutricional e aspectos relacionados. Tese de doutoramento, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro-SP.

Noda, S.C.M., Rodrigues, E.R., Giannotti, E. (2001). Dominance hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp

*Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). *Sociobiology*, 38(3)B: 603–614.

Noda, S.C.M., Shima, S.N. & Noll, F.B. (2003). Morphological and physiological caste differences in *Synoeca cyanea* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini) according to ontogenetic development of the colonies. *Sociobiology*, 41: 547–570.

Noll, F.B., Simões, D. & Zucchi, R. (1997). Morphological caste differences in the Neotropical swarm-founding wasps: *Agelaia m. multipicta* and *Agelaia p. pallipes* (Hymenoptera, Vespidae). *Ethol. Ecol. Evol.*, 4(9): 361–372.

Noll, F.B., Wenzel, J.W. & Zucchi, R. (2004). Evolution of caste in Neotropical swarm-founding wasps (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). *Am. Mus. Novit.*, 3467: 1–24.

O'Donnell, S. (1998). Reproductive caste determination in eusocial wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Annu. Rev. Entomol.*, 43: 323–346.  
DOI:10.1146/annurev.ento.43.1.323.

Pardi, L. & Piccioli, M.T.M. (1981). Studies on the biology of *Belonogaster* (Hymenoptera: Vespidae). 4. On caste differences on *Belonogaster griseus* (Fab.) and the position of this genus among social wasps. *Monit. Zool. Ital.*, 16(9): 131–146.

Premnath, S., Sinha, A., Gadagkar, R. (1996). Dominance relationship in the establishment of reproductive division of labour in a primitively eusocial wasp (*Ropalidia marginata*). *Behav Ecol Sociobiol.*, 39 : 125–132.

Provost, E., Blight, O., Tirard, A. & Renucci, M. (2008). Hydrocarbons and insects' social physiology. In R.P. Maes (Ed.), *Insect Physiology: new research* (pp. 19–72). Nova Science Publishers.

Quinn, G.P. & Keough, M.J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Richards, O.W. (1971). The biology of the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). *Biol. Rev.*, 46: 483–528.
- Richards, O.W. (1978). The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae. London: British Museum Natural History.
- Richards, O.W. & Richards, M.J. (1951). Observations on the social wasps of South America (Hymenoptera, Vespidae). *Trans. R. Entomol. Soc. Lond.*, 102: 1–170.
- Shima, S.N., Yamane, S. & Zucchi, R. (1994). Morphological caste differences in some Neotropical swarm-founding Polistinae wasps I. *Apoica flavissima* (Hymenoptera, Vespidae). *Jpn. J. Entomol.*, 64(10): 811–822.
- Sinha, A., Premnath, R., Chandrashekara, K. & Gadagkar, R. (1993). *Ropalidia rufoplagiata*: a polistine wasp society probably lacking permanent reproductive division of labour. *Ins. Soc.*, 40: 69–86.
- Sinzato, D.M.S., Prezoto, F. & Del-Claro, K. (2003). The role of males in a neotropical paper wasp, *Polistes ferreri* Saussure, 1853 (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Rev. Bras. Zooc.*, 5(1): 89–100.
- Sinzato, D.M.S., Andrade, F.R., De Souza, A.R., Del-Claro, K. & Prezoto, F. (2011). Colony cycle, foundation strategy and nesting biology of a Neotropical paper wasp. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 84: 357–363.
- Sledge, M.F., Boscaro, F. & Turillazzi, S. (2001). Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49: 401–409. DOI:10.1007/s002650000311.
- Solis, C.R. & J. Strassmann, E. (1990). Presence of brood affects caste differentiation in the social wasp, *Polistes exclamans* Viereck (Hymenoptera: Vespidae). *Funct. Ecol.*, 4: 531–541.

Spradbery, J.P. (1973). Wasps: An account of the biology and natural history of solitary and social wasps. London, Seattle: University of Washington Press.

Spradbery, J.P. (1991). Evolution of queen number and queen control. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds.), The social biology of wasps (pp. 191–231). Ithaca, New York: Cornell University Press.

Strassmann, J. E. & Meyer, D.C. 1983: Gerontocracy in the social wasp, *Polistes exclamans*. Anim. Behav., 31(1): 431–438.

Strassmann, J.E., Meyer, D.C. & Marlock, R.L. (1984). Behavioral castes in the social wasp, *Polistes exclamans* (Hymenoptera: Vespidae). Sociobiology, 8: 211–224.

Tannure, I.C. & Nascimento, F.S. (1999). Influência do conflito de dominância entre fundadoras em colônias de vespas sociais pertencentes ao gênero *Polistes* (Hymenoptera, Vespidae). Rev. Bras. Zooc., 1(1): 31–40.

Tannure-Nascimento, I.C., Nascimento, F.S. & Zucchi, R. (2005). Size and colony cycle in *Polistes satan*, a Neotropical paper wasp (Hymenoptera, Vespidae). Ethol. Ecol. Evol., 17: 105–119. DOI: 10.1080/08927014.2005.9522601.

Tannure-Nascimento, I.C., Nascimento, F.S. & Zucchi R. (2008). The look of royalty: visual and odour signals of reproductive status in a paper wasp. Proc. R. Soc. B., 275: 2555–2561.

Torres, V.O., Antonialli-Junior, W.F. & Giannotti, E. (2009). Divisão de trabalho em colônias da vespa social neotropical *Polistes canadensis canadensis* Linnaeus (Hymenoptera, Vespidae). Rev. Bras. Entomol., 53(4): 593–599.

Torres, V.O., Montagna, T.S., Raizer, J. & Antonialli-Junior, W.F. (2012). Division of labor in colonies of the eusocial wasp, *Mischocyttarus consimilis*. J. Insect Sci., 12:21. DOI:10.1673/031.012.2101.

Turillazzi, S. (1991). The Stenogastrinae. In K.G. Ross & R.W. Matthews (Eds.), *The social biology of wasps* (pp. 74–98). Ithaca, New York: Cornell University Press.

West-Eberhard, M.J. (1969). The social biology of Polistinae wasps. *Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.*, 140: 1–101.

West-Eberhard, M.J. (1973): Monogyny in “polygynous” social wasps. *Proc. 7th Cong. I.U.S.S.I. London*, pp. 396–403.

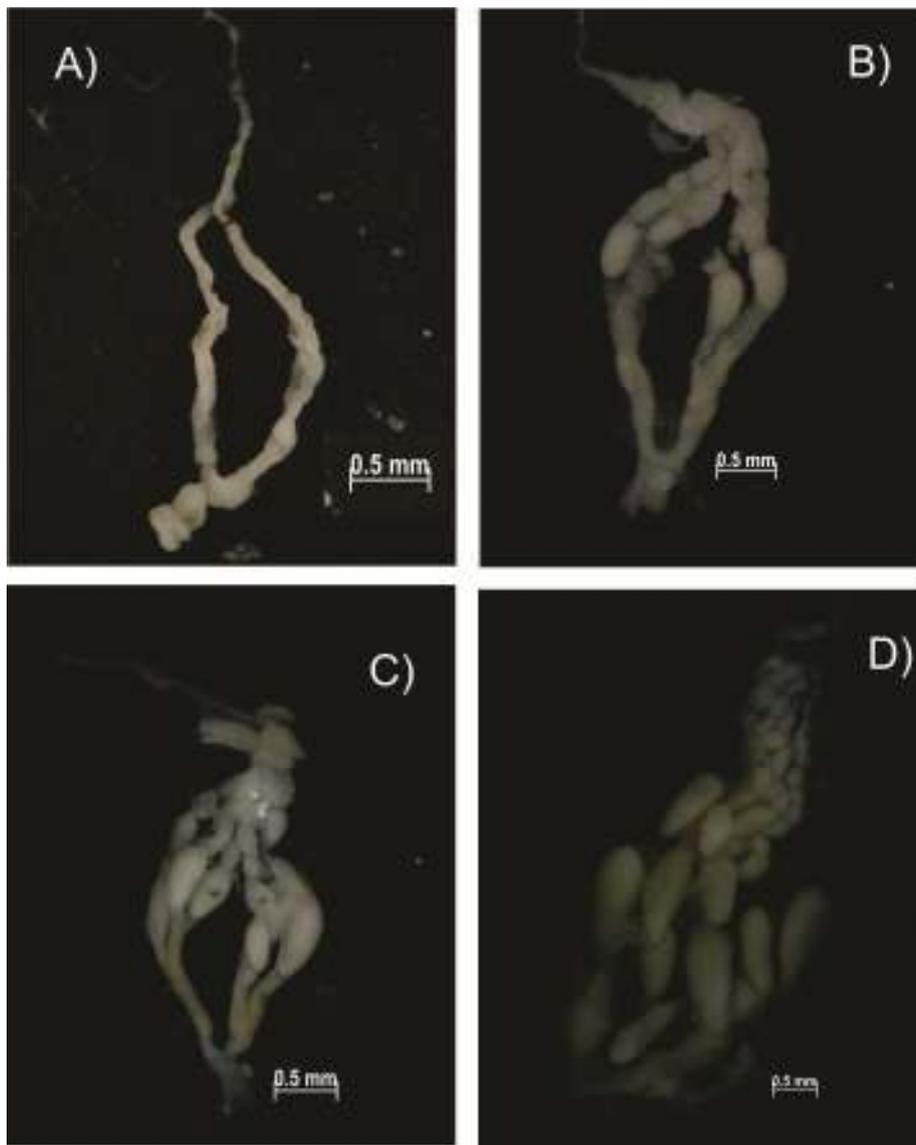
West-Eberhard, M.J. (1978a). Polygyny and the evolution of social behavior in wasps. *J. Kans. Entomol. Soc.*, 51: 832–856.

West-Eberhard, M.J. (1978b): Temporary queens in *Metapolybia* wasps: non-reproductive helpers without altruism? *Science*, 200: 441–443.

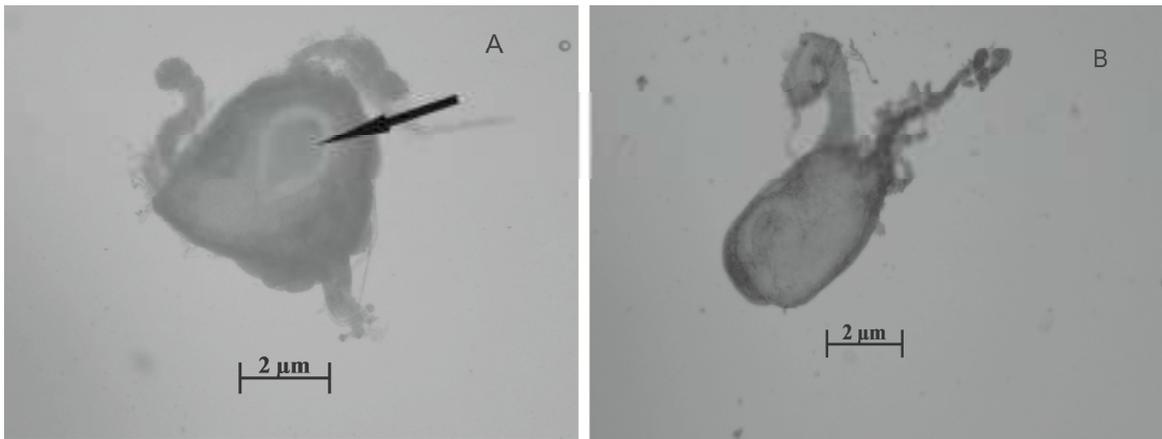
Wilson, E.O. (1971). *The insect societies*. Cambridge: The Belknap Press.

**Tabela I.** Picos que foram significativos para a separação dos grupos de fêmeas de *Polistes ferreri*, o número de onda, os resultados das duas raízes da análise discriminante, os grupos funcionais e os modos de vibração dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho para o perfil químico dos grupos.

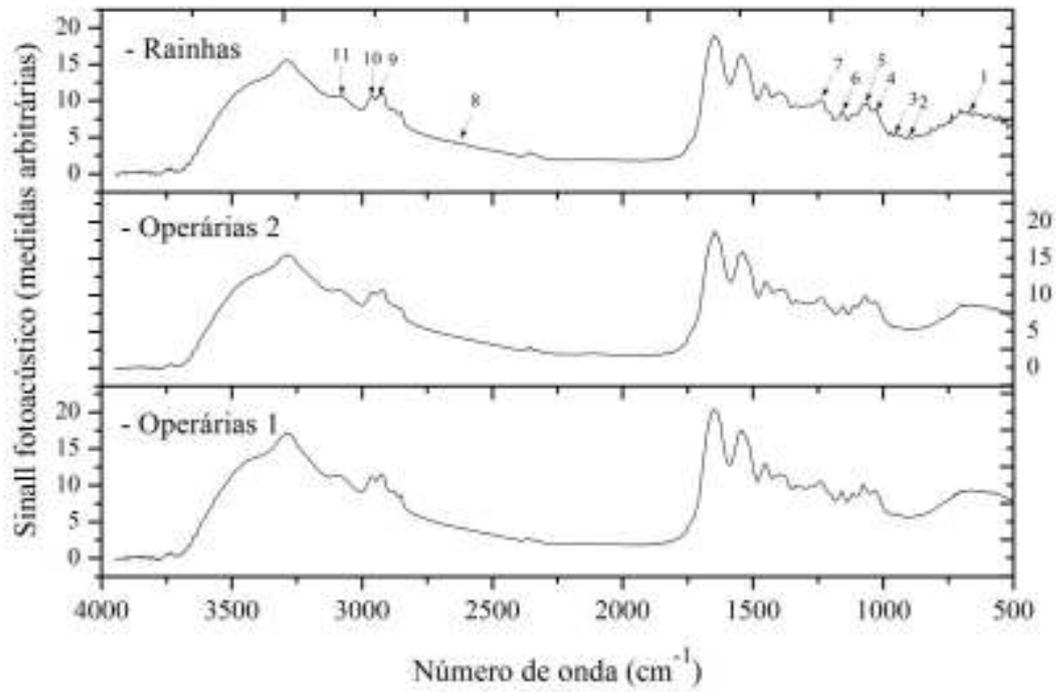
Peak	Number (cm <sup>-1</sup> )	Raiz Canônica 1	Raiz Canônica 2	Grupo Funcional	Modo de vibração
(1)	667	1.002	0.472	Fora do plano	Dobra
(2)	895	1.843	0.154	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
(3)	953	-1.250	1.183	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
(4)	1030	-2.597	-1.436	No plano C-H (benzeno)	Dobra
(5)	1076	1.660	2.183	No plano C-H (benzeno)	Dobra
(6)	1157	-0.771	-3.649	No plano C-H (benzeno)	Dobra
(7)	1238	0.328	3.259	-C-N	Estiramento
(8)	2634	-1.240	1.083	C-N e C-CH <sub>3</sub>	Dobra de sobreposição
(9)	2962	1.257	-4.449	-C-H (CH <sub>3</sub> )	Estiramento assimétrico
(10)	3082	-1.760	1.727	N-H	Dobra de sobreposição
(11)	3290	0.359	2.010	-N-H	Estiramento



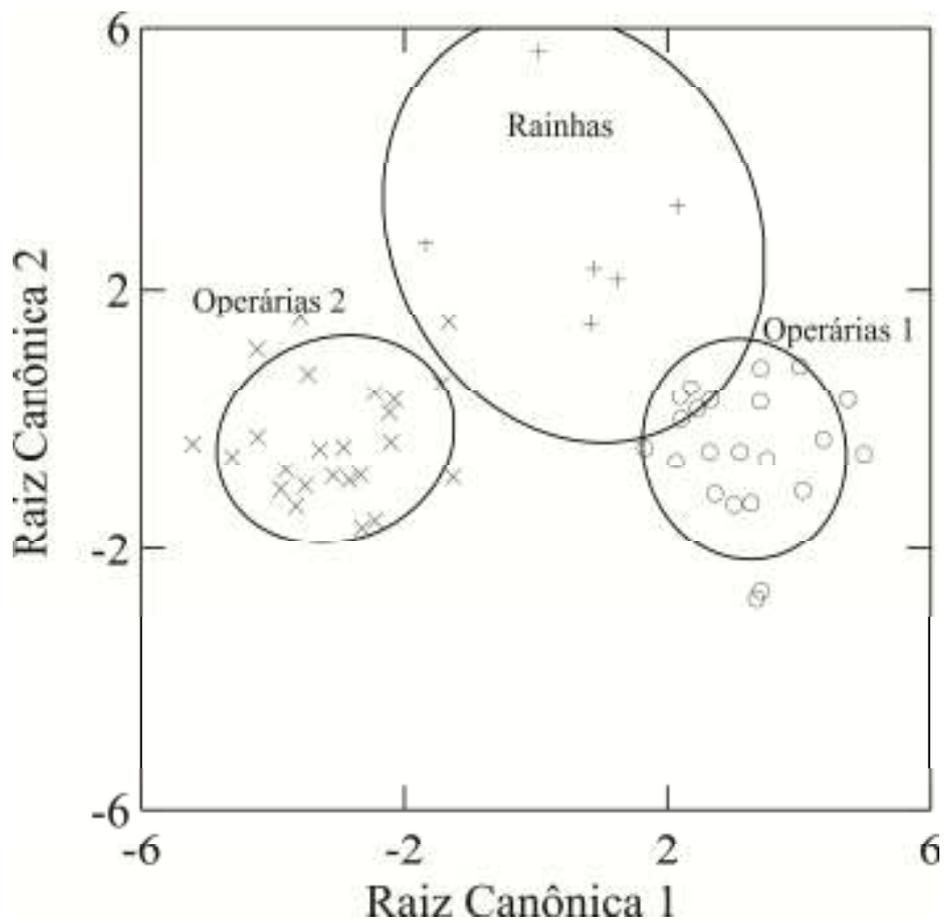
**Figura 1.** Quatro tipos de desenvolvimento ovariano encontrados em fêmeas de *Polistes ferreri*. Tipo A, ovários filamentosos sem oócitos em desenvolvimento; tipo B, ovários contendo alguns oócitos em início de desenvolvimento; tipo C, ovários apresentando oócitos moderadamente desenvolvidos e alguns em fase final de vitelogênese; e tipo D, ovários longos e bem desenvolvidos, cada um contendo dois ou mais oócitos maduros.



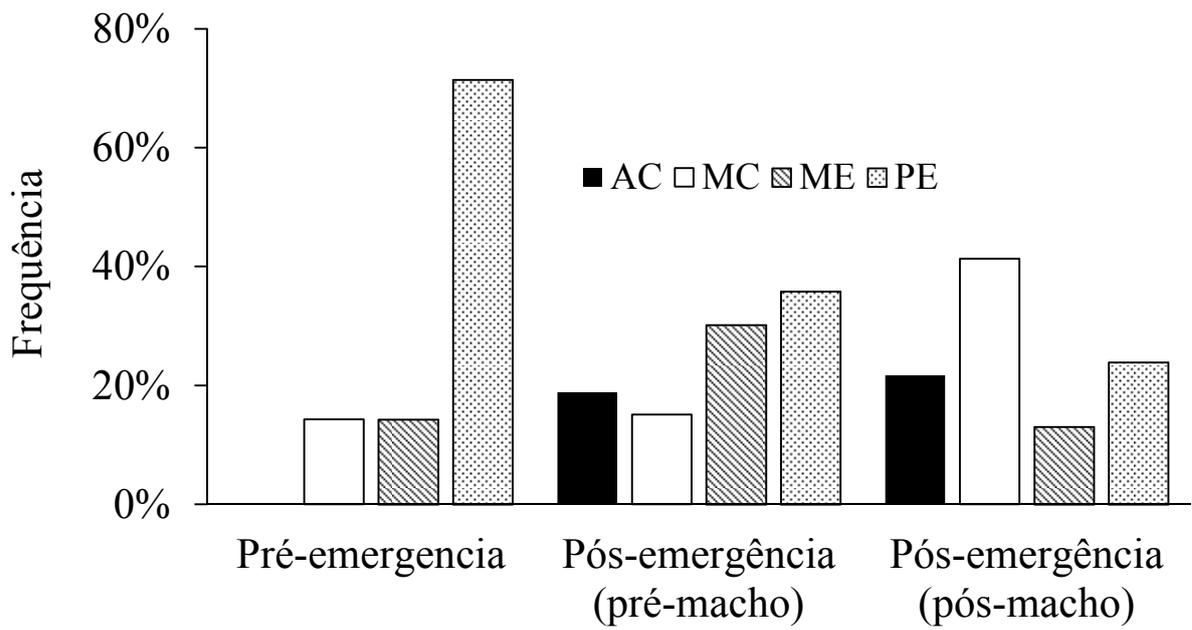
**Figura 2.** Espermateca de fêmeas de *Polistes ferreri*. A) Inseminada, com seta destacando o pacote de espermatozoides; B) Não inseminada.



**Figura 3.** Espectros de absorção no infravermelho médio para os três grupos de fêmeas de *Polistes ferreri* de acordo com o perfil químico, indicando os picos significativos para a separação dos grupos.



**Figura 4.** Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação entre o perfil de hidrocarbonetos cuticulares e os grupos segundo o desenvolvimento ovariano em fêmeas de *Polistes ferreri*.



**Figura 5.** Frequência das idades relativas das fêmeas de *Polistes ferreri* em diferentes estágios do ciclo colonial de acordo com a coloração do apódema. AM= amarelo claro; MC= marrom claro; ME= marrom escuro; e PE= preto.

Viviana de Oliveira Torres

Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Universidade Federal da Grande Dourados, 79804-970, Dourados-MS, Brazil.

vivianabio@yahoo.com.br

**Status Reprodutivo da Vespa Social *Polistes versicolor* (Hymenoptera,  
Vespidae)**

VO TORRES<sup>1</sup>; D SGUARIZI-ANTONIO<sup>2</sup>; LHC ANDRADE<sup>2</sup> & WF  
ANTONIALLI-JUNIOR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.  
vivianabio@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

RESUMO: Uma característica fundamental na evolução dos insetos sociais é a distinção entre as castas, na qual a presença de maior diferenciação entre elas indica maior grau de socialidade. O objetivo deste estudo foi avaliar fatores que podem indicar o status reprodutivo das fêmeas nas colônias da vespa social *Polistes versicolor*. O status reprodutivo de cada fêmea foi examinado por meio de caracteres morfométricos, pelo perfil químico da cutícula, inseminação e idade relativa. Os resultados demonstram que em colônias desta espécie há três grupos de fêmeas que apresentam distintos perfis químicos da cutícula. O primeiro grupo é de fêmeas com ovariolos filamentosos, típico de operárias; o segundo de fêmeas com ovariolos parcialmente desenvolvidos; e o terceiro das rainhas, as quais estão entre as fêmeas mais velhas, inseminadas e que apresentam maior grau de desenvolvimento ovariano dentre todas as fêmeas. Por outro lado, não há diferenças morfológicas entre estes grupos de fêmeas, contudo, outros fatores tais como a idade, a inseminação e a composição química da cutícula são importantes para indicar a condição fisiológica reprodutiva da fêmea na colônia.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos cuticulares, desenvolvimento ovariano, Polistinae.

## **Reproductive Status of the Social Wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae)**

ABSTRACT: A fundamental feature in the evolution of social insects is the separation of castes, and the presence of wide differentiation between castes indicates a more advanced degree of sociability. In this study, we evaluated factors that indicate the reproductive status of females in colonies of the social wasp *Polistes versicolor*. The reproductive status of each female was examined by measuring nine morphometric characters, by the cuticular hydrocarbon profile, insemination and by her relative age. We conclude that in *P. versicolor* colonies there are 3 female groups that show cuticular chemical profile difference. The first group belong to females with ovarioles filamentous, typical of workers; the second is females with ovarioles intermediates; and the third is a group of queens, which are older females, inseminated and with greater degree of ovarian development found among all females. On the other hand, there was no significant morphological differences between these female groups. Therefore, although no significant morphological differences among females there are other factors such as relative age, insemination and the cuticular chemical composition that is an indicative of reproductive physiological condition of female in the colony.

Keywords: Cuticular hydrocarbons, Ovarian development, Polistinae.

## Introdução

Uma importante característica para o sucesso ecológico dos insetos sociais é a divisão de trabalho que ocorre na colônia entre os indivíduos (Wilson, 1985). Por este motivo, os autores têm se dedicado a investigar quais são os parâmetros que determinam este traço evolutivo, sobretudo a determinação e distinção entre as castas (Robinson, 1992; O'Donnell, 1995; O'Donnell, 1998).

A subfamília Polistinae em particular apresenta características evolutivas que a torna importante para entender como estes parâmetros evoluíram nas vespas eussociais (Ross & Matthews, 1991). Neste grupo, o grau de diferenças morfológicas entre as castas deste grupo podem variar de ausência total (Richards, 1971; Strassmann et al., 2002) até diferenças nítidas entre as castas. Este aspecto, de fato, pode ser uma característica fundamental na evolução dos insetos sociais, uma vez que a presença de grande diferenciação entre as castas indica maior grau de socialidade (Bourke, 1999).

Em grupos de Polistinae menos derivados, como *Polistes* e *Mischocyttarus*, as fêmeas distinguem-se pelos seus comportamentos, hierarquia de dominância, grau de desenvolvimento ovariano e/ou por sua fisiologia reprodutiva (Röseler et al., 1985). Nestes gêneros, o estado de dominância do indivíduo aparentemente inicia uma resposta fisiológica direta que afeta seu desenvolvimento ovariano (Wheeler, 1986), sendo a rainha a fêmea com mais elevado grau de desenvolvimento ovariano, dominando com estratégias comportamentais, todas as outras fêmeas e monopolizando a reprodução, enquanto evita tarefas de alto custo energético, tais como a atividade forrageadora (Jeanne, 1972; Strassmann & Meyer, 1983).

Para o estabelecimento desta hierarquia, no entanto, é necessário que mecanismos de reconhecimento sejam utilizados por cada membro da colônia e a

comunicação química é o meio mais efetivo para isto. Dentre os compostos envolvidos nesse processo estão os hidrocarbonetos cuticulares (HCs), os quais compõem a cutícula dos insetos, evitando dessecação dos indivíduos (Lockey, 1988) e criando uma barreira contra microorganismos (Provost et al., 2008).

Além disso, segundo Provost et al. (2008) os HCs também atuam como feromônios de contato, os quais atuam no reconhecimento de co-específicos, na identificação do status fisiológico das fêmeas, estando portanto, diretamente relacionado ao ranque hierárquico das fêmeas e podendo ser utilizado para identificação da função individual na colônia.

Sledge et al. (2001) e Monnin (2006) notaram que há uma forte correlação entre o status reprodutivo e o perfil de HCs de cada indivíduo nas colônias de vespas. De acordo com Dapporto et al. (2005) em colônias de *Polistes dominula* (Christ) fundadas por uma única fêmea, o perfil de HCs da rainha e de suas filhas são diferentes, e quando estas colônias se tornam orfãs, uma operária assume a posição da rainha, desenvolve seus ovários e adquire um perfil de HCs similar ao da rainha original.

A manutenção de um monopólio reprodutivo pela rainha é um dos marcos atingido pelos insetos sociais. Em espécies de fundação independente acreditava-se que a rainha mantinha seu status reprodutivo usando agressividade para com as demais fêmeas, contudo, nas últimas décadas diversos estudos vêm demonstrando a importância e o papel dos HCs na comunicação entre membros das colônias e a manutenção do status da rainha (Bonavita-Cougourdan et al., 1991; Peeters et al., 1999; Liebig et al., 2000; Sledge et al., 2001; Dapporto et al., 2005).

Portanto, este estudo objetivou analisar o status reprodutivo de fêmeas de *Polistes versicolor* por meio de caracteres morfológicos, fisiologia reprodutiva e pelo perfil químico da cutícula.

## **Material e Métodos**

Foram coletadas 10 colônias de *P. versicolor* na região Sul do Estado de Mato Grosso do Sul, nas cidades de Dourados (22°13'16" S 54°48'20" W) e Mundo Novo (23°56'23" S 54°17'25"W). Para as análises morfológicas, fisiológicas e do perfil químico da cutícula foram avaliadas todas as fêmeas das colônias. A classificação do estágio colonial foi realizada de acordo com Jeanne (1972).

Após a coleta, o gáster de cada fêmea foi individualmente fixado em epperndorf contendo álcool etílico absoluto (99,8% PA) para posterior análise do grau de desenvolvimento ovariano, inseminação e idade relativa. O restante do corpo foi preservado por congelamento para tomada de medidas morfométricas e análise do perfil químico da cutícula.

Para detectar diferenças morfológicas entre as fêmeas foram realizadas nove medidas morfométricas, modificada de Shima et al. (1994) e Noll et al. (1997), em cada fêmea, em diferentes partes do corpo: Cabeça: largura da cabeça (LC) e distância interorbital mínima (DI<sub>m</sub>); Mesosoma: largura do mesoscuto (LM), comprimento do mesoscuto (CM) e altura do mesoscuto (AM); Metassoma: largura basal do II tergito (LbI<sub>ter</sub>), largura apical do II tergito (LaI<sub>ter</sub>) e comprimento do II tergito (CI<sub>ter</sub>); Asa: comprimento parcial da asa anterior (CA).

Os gásteres foram dissecados sob estereomicroscópio binocular Zeiss para avaliação do grau de desenvolvimento, inseminação e idade relativa. Os ovários foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento dos ovariólos, baseado nas observações de Baio et al. (2004).

Para cada fêmea, a espermateca foi removida e colocada numa lâmina com solução de fucsina ácida 1% para determinar a presença ou não de espermatozóides utilizando um microscópio.

A idade relativa das fêmeas foi determinada de acordo com a pigmentação progressiva do apódema transversal por meio da base do quinto esternito, como segue: AC (amarelo claro), MC (marrom claro), ME (marrom escuro) e P (preto), que segundo Richards (1971) e West-Eberhard (1973) indicam uma progressão na idade de fêmeas jovens (AC) para mais velhas (P).

Para análise dos perfis químicos da cutícula os tórax de cada fêmea foram submetidos à técnica de Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS) após permanecer em estufa à vácuo por no mínimo 48 horas para minimizar a absorção de umidade. Esta técnica tem sido utilizada por Antonialli-Junior et al. (2007 e 2008) e Neves et al. (2012) e tem se mostrado confiável para avaliar os perfis de HCs de formigas e vespas, mesmo quando comparada com a cromatografia gasosa (Ferreira et al., 2012).

A técnica FTIR-PAS é uma medida da radiação absorvida pela amostra e pode ser aplicada em materiais de grande fragilidade, como os materiais biológicos, pois a baixa intensidade da radiação não destrói a amostra. Esta técnica usa o espectro infravermelho de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (Silverstein & Webster, 2000; Skoog et al., 2002), o qual é sensível às vibrações e rotações de grupos químicos moleculares, permitindo-nos identificar e distinguir radicais moleculares e algumas ligações químicas nas amostras (Smith, 1999).

O espectro resultante para cada tórax foi obtido pela média de 64 espectros com resolução de  $8 \text{ cm}^{-1}$ , no qual foram separados as linhas de absorção entre 400 e  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , principalmente aquelas relacionadas às vibrações de hidrocarbonetos cuticulares.

Os graus de desenvolvimento ovariano, os dados morfométricos e o perfil químico da cutícula foram avaliados por meio de análises discriminantes, que revelam o grupo de variáveis que melhor explicam os grupos analisados, caso haja diferença, o qual é indicado pelo Wilk's Lambda, uma medida de diferença, se houver, entre os grupos (Quinn & Keough, 2002). Para testar associação entre a idade relativa e os 3 grupos de fêmeas (operárias, intermediárias e rainhas) foi realizado o teste do qui-quadrado. Para todas as análises, a variável foi considerada significativa quando o nível atingido foi  $< 0,05$ .

## **Resultados e Discussão**

Foram encontrados quatro tipos de desenvolvimento ovariano entre as fêmeas nas colônias desta espécie: tipo A, ovários filamentosos, que não apresentam oócitos visíveis; tipo B, ovários contendo alguns oócitos em início de desenvolvimento; tipo C, ovários apresentando oócitos moderadamente desenvolvidos e alguns em fase final de vitelogênese; e tipo D, ovários longos e bem desenvolvidos, cada um produzindo de dois a vários oócitos (Fig. 1 A-D). As fêmeas que apresentavam o tipo D de desenvolvimento ovariano sempre estavam inseminadas.

Estas quatro condições fisiológicas foram descritas por Baio et al. (2004) para *Brachygastra augusti* (Saussure). Noll et al. (2004) também descreveram condições semelhantes em *Apoica pallens* (Fabricius), *Charterginus fulvus* (Fox) e *Nectarinella championi* (Dover). Em todas as espécies, as fêmeas com maior grau de desenvolvimento ovariano também eram as fêmeas que estavam inseminadas.

Entretanto, Giannotti and Machado (1999), Gobbi et. al (2006) e Murakami et al. (2009) analisaram espécies de fundação independente, dentre elas *P. lanio*, *P. versicolor* e *Mischocyttarus cassununga* (von Ihering) e encontraram seis, cinco e cinco padrões de desenvolvimento ovariano, respectivamente, para estas espécies.

Outros trabalhos que avaliaram a relação entre o grau de desenvolvimento ovariano e a posição ocupada pelas fêmeas foram realizados com *Parachartergus smithii* (Saussure) (Mateus et al., 1997), *Pseudopolybia vespiceps* (Ducke) (Shima et al., 1998), *Chartergellus communis* (Richards) (Mateus et al., 1999), *Brachygastra lecheguana* (Latreille) (Shima et al., 2000), *Parachartergus fraternus* (Gribodo) (Mateus et al., 2004) e *Protopolybia chartegoides* (Gribodo) (Felippotti et al., 2007), todas espécies da tribo Epiponini.

As colônias de *P. versicolor* apresentaram, em média  $2,9 \pm 1,72$  fêmeas inseminadas, comprovando o potencial de outras fêmeas para substituir a rainha, entretanto, somente uma fêmea apresentava condição ovariana típica de uma poedeira (Fig. 1D). Giannotti and Machado (1999) e Murakami et al. (2009) também relatam a inseminação de mais de uma fêmea nas colônias de *P. lanio* e *M. cassununga*, respectivamente. De fato, a presença de mais de uma fêmea inseminada, com capacidade reprodutiva na colônia é uma característica comum em espécies de fundação independente, como é caso de *Polistes* e *Mischocyttarus*, evidenciando que a diferenciação entre fêmeas reprodutivas e não reprodutivas é bastante flexível e complexa, dependendo de aspectos fisiológicos, comportamentais e também ecológicos (Murakami & Shima, 2006).

A inseminação de duas ou mais fêmeas numa mesma colônia pode ser uma estratégia para superar eventuais problemas, ao longo do ciclo colonial, como por exemplo, predação e ou parasitismo das colônias, como foi sugerido por Murakami et

al. (2009) para *M. cassununga*. Gobbi et al. (2006) identificaram que 75% das fêmeas de *P. versicolor* nos agregados e 85% nas fundações por associação estão inseminadas, portanto, a inseminação deve ocorrer antes da formação dos agregados.

Os resultados obtidos pela análise discriminante das fêmeas a partir dos perfis químicos da cutícula e dos tipos de desenvolvimento ovariano demonstra que as fêmeas podem ser diferenciadas em 3 categorias: a) Operárias 1, com ovariolos filamentosos, tipo A; b) Operárias 2, com ovariolos parcialmente desenvolvidos, tipos B e C; e c) Rainhas, com ovariolos completamente desenvolvidos, tipo D (Figs. 1 e 2). Estas diferenças foram significativas (Wilks' Lambda = 0,476, F = 6,303, p <0,001) (Fig. 3).

O espectro analisado por FTIR-PAS mostrou diferenças significativas entre os perfis químicos da cutícula indicando sete picos significativos para a separação dos grupos de fêmeas (Fig. 2 e Tabela I). Estes compostos estão relacionados a quitina (1238, 1523 e 2634  $\text{cm}^{-1}$ ) e aos HCs (667, 1030, 1377 e 1450  $\text{cm}^{-1}$ ) presentes na cutícula da fêmea (Tab. I). Antonialli-Junior et al. (2007) e Neves et al. (2012) discutem a importância destes picos para a distinção dos grupos analisados. Entretanto, os picos mais significativos para estes grupos são aqueles correspondentes à bandas de hidrocarbonetos (Fig. 2 e Tab. I).

A primeira raiz canônica explicou 93% dos resultados e a segunda, 7%; juntas explicaram 100% dos resultados. Portanto, parece que cada fêmea dentro destes três grupos possuem um estado fisiológico diferente dentro da colônia, o que leva a uma diferença no perfil químico da cutícula e, provavelmente, no reconhecimento por outras fêmeas de sua posição na hierarquia da colônia.

Segundo Monnin (2006) existe correlação entre o status reprodutivo e o perfil de HCs nos insetos sociais, logo essa diferenciação é importante para o estabelecimento de uma hierarquia em espécies com fundação independente como é o caso de muitos

Polistinae neotropicais. Em colônias de *P. dominula* fundadas por uma única fêmea foi encontrada diferença entre o perfil de HCs dessa rainha e das operárias (Dapporto et al. 2005). Bonckaert et al. (2012) investigando colônias de *Vespula vulgaris* (Linnaeus) avaliaram que rainhas poedeiras, rainhas em agregados, rainhas virgens e operárias apresentavam diferentes graus de desenvolvimento ovariano e que correspondiam aos seus respectivos perfis de hidrocarbonos cuticulares.

A análise discriminante dos 3 grupos de fêmeas com diferentes perfis químicos, entretanto, não mostrou diferenças morfológicas significativas (Wilks' Lambda = 0,851, F = 3,182, p <0,05) indicando ausência de diferenças morfológicas entre estes grupos. A ausência de diferenças morfológicas entre as castas também foi relatada por Giannotti and Machado (1999) para *P. lanio* e por Murakami et al. (2009) para *M. cassununga*, todas espécies de fundação independente. Entretanto, Gobbi et al. (2006) observou que fêmeas de agregados de *P. versicolor* são significativamente maiores do que outros indivíduos, e as primeiras fêmeas que emergem na colônia são menores. Tannure-Nascimento et al. (2005) sugerem que diferenças morfológicas entre fêmeas reprodutivas e não-reprodutivas de *Polistes satan* (Bequaert) durante o ciclo colonial ocorre devido a diferenças nutricionais sazonais.

De fato, a maioria dos estudos descrevem ausência de diferenças morfológicas entre as castas em *Polistes* e *Mischocyttarus* (Cumber, 1951; Giannotti & Machado, 1999; Tannure-Nascimento et al., 2005; Murakami et al., 2009), o que dá suporte a hipótese de determinação de casta pós-imaginal. Entretanto, estudos tais como o de Gadagkar et al. (1991), Keeping (2002), Dapporto et al. (2008) e Hunt et al. (2011) realizados com *Ropalidia marginata* (Fabricius), *Belonogaster petiolata* (DeGeer), *Polistes metricus* (Say) e *P. dominula*, respectivamente, mostram que ao menos em parte, a distinção de castas pode ser pré-imaginal.

Pela análise da idade relativa das fêmeas é possível identificar que há uma frequência maior de fêmeas jovens no período de pós-emergência (pré-macho) e que à medida que o estágio colonial avança, fêmeas velhas passam a ser mais frequentes nos períodos de pós-emergência (pós-macho) e durante o declínio (Fig. 4). Além disso, o teste do qui-quadrado ( $X^2= 65,594$ ,  $df=6$ ,  $p < 0,05$ ) revela uma relação entre a idade da fêmea e o seu grau de desenvolvimento ovariano, sendo que as rainhas estão sempre entre as fêmeas mais velhas da colônia. Já as operárias apresentam variação de idade, a qual provavelmente está relacionada ao estágio do ciclo colonial.

Corroborando estes resultados, Baio et al. (2003), Murakami et al. (2009) e Felippotti et al. (2010), investigando colônias de *Metapolybia docilis* (Richards), *M. cassununga* e três espécies de *Chypearia*, respectivamente, relataram que rainhas estão entre as fêmeas mais velhas da colônia e que a presença de fêmeas jovens e velhas varia de acordo com o estágio do ciclo colonial. Murakami et al. (2009) observaram que as fêmeas com maior grau de desenvolvimento ovariano são as mais velhas e também as mais agressivas no ranking hierárquico. Todos estes resultados, portanto, comprovam o sistema de gerontocracia (Strassmann & Meyer, 1983), comum em espécies de fundação independente, no qual à medida que as operárias envelhecem sofrem mais atos agressivos da fêmea dominante.

Pode-se concluir, portanto, que em *P. versicolor* há três grupos de fêmeas que apresentam diferentes perfis químicos cuticulares. O primeiro grupo é de fêmeas com ovariolos filamentosos, típico de operárias; o segundo, fêmeas com ovariolos parcialmente desenvolvidos; e o terceiro é o grupo das rainhas, as quais estão entre as fêmeas mais velhas, são inseminadas e apresentam maior grau de desenvolvimento ovariano. Por outro lado, não houve diferenças morfológicas significativas entre estes grupos de fêmeas. Portanto, apesar de não haver diferenças morfológicas entre as

fêmeas, outros fatores tais como a idade relativa, a inseminação e a composição química da cutícula atuam como indicativos da condição fisiológica reprodutiva de cada fêmea na colônia.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Janet W. Reid (JWR Associates) pela revisão do texto em inglês, e ao Prof. Dr. Orlando T. Silveira (Museu Paraense Emílio Goeldi) pela identificação da espécie. Nós agradecemos ainda ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade de WFAJ e à CAPES pela bolsa de doutorado à primeira autora.

## Referências

- Antonialli-Junior, W.F., Lima, S.M., Andrade, L.H.C. & Y.R. Suárez. (2007). Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 6: 492–499.
- Antonialli-Junior, W.F., Andrade, S.M., Suárez, Y.R. & Lima, S.M. (2008). Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Res.*, 7: 559–566.
- Baio, M.V., Noll, F.B. & Zucchi, R. (2003). Shape differences rather than size differences between castes in the Neotropical swarm-founding wasp *Metapolybia docilis* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *BMC Evol. Biol.*, 3: 10.  
DOI:10.1186/1471-2148-3-10.
- Baio, M.V., Noll, F.B. & Zucchi, R. (2004). Morphological caste differences and non-sterility of workers in *Brachygastra augusti* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini), a Neotropical swarm-founding wasp. *J. New York Entomol. Soc.*, 111(4): 243–253.  
DOI:10.1664/0028-7199(2003)111[0242:MCDANO]2.0.CO;2.
- Bonavita-Cougourdan, A., Theraulaz, G., Bagnères, A.G., Roux, M., Pratte, M., Provost, E. & Clément, J.L. (1991). Cuticular hydrocarbons, social organization and ovarian development in a polistine wasp: *Polistes dominulus* Christ. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100: 667–680. DOI.org/10.1016/0305-0491(91)90272-F.
- Bonckaert, W., Drijfhout, F.P., D’Ettorre, P., Billen, J. & Wenseleers, T. (2012). Hydrocarbon signatures of egg maternity, caste membership and reproductive status in the common wasp. *J. Chem. Ecol.*, 38(1): 42–51. DOI:10.1007/s10886-011-0055-9.

- Bourke, A.F.G. (1999). Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. *J. Evol. Biol.*, 12(2): 245–25. DOI:10.1046/j.1420-9101.1999.00028.x.
- Cumber, R.A. (1951). Some observations on the biology of the Australia wasp *Polistes humilis* Fabr. (Hymenoptera: Vespidae) on northe Auckland (New Zeland) with special reference to the nature of work caste. *P. Roy. Entomol. Soc. Lond.*, 26: 11–16. DOI: 10.1111/j.1365-3032.1951.tb00104.x.
- Dapporto, L., Sledge, F.M. & Turillazzi, S. (2005). Dynamics of cuticular chemical profiles of *Polistes dominulus* workers in orphaned nests (Hymenoptera, Vespidae). *J. Insect Physiol.*, 51(3): 969–973. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2005.04.011.
- Dapporto, L., Lambardi, D. & Turillazzi, S. (2008). Not only cuticular lipids: First evidence of differences between foundresses and their daughters in polar substances in the paper wasp *Polistes dominulus*. *J. Insect Physiol.*, 54: 89–95. DOI:10.1016/j.jinsphys.2007.08.005.
- Felippotti, G.T., Noll, F.B. & Mateus, S. (2007). Morphological studies on castes of *Protopolybia chartergoides* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini) observed in colonies during male production stage. *Rev. Bras. Entomol.*, 51: 494–500. DOI.org/10.1590/S0085-56262007000400015.
- Felippotti, G.T., Mateus, L., Mateus, S., Noll, F.B. & Zucchi, R. (2010). Morphological caste differences in three species of the Neotropical genus *Clypearia* (Hymenoptera: Polistinae: Epiponini). *Psyche: A J. Entomol.*, 1–9. DOI.org/10.1155/2010/410280
- Ferreira, A.C., Cardoso C.A.L., Neves, E.F., Suárez, Y.R., Antonialli-Junior, W.F. (2012). Distinct linear hydrocarbon profiles and chemical strategy of facultative parasitism among *Mischocyttarus* wasps. *Genet. Mol. Res.*, 11(4): 4351-4359. DOI: 10.4238/2012.

- Gadagkar, R., Bhagavan, S., Chandrashekara, & Vinutha, C. (1991). The role of larval nutrition in pre-imaginal biasing of caste in the primitively eusocial wasp *Ropalidia maginata* (Hymenoptera: Vespidae). *Ecol. Entomol.*, 16: 435–440.  
DOI: 10.1111/j.1365-2311.1991.tb00236.x.
- Giannotti E., & Machado, V.L.L. (1999). Behavioral castes in the primitively eusocial wasp *Polistes lanio* Fabricius (Hymenoptera: Vespidae). *Rev. Bras. Entomol.*, 43: 185–190.
- Gobbi, N., Noll, F.B. & Penna, M.A.H. (2006). “Winter” aggregations, colony cycle, and seasonal phenotypic change in the paper wasp *Polistes versicolor* in subtropical Brazil. *Naturwissenschaften*, 93(10): 487–494. DOI: 10.1007/s00114-006-0140-z.
- Hunt, J.H., Mutti, N.S., Havukainen, H. Henshaw, M.T. & Amdam G.V. (2011). Development of an RNA interference tool, characterization of its target, and an ecological test of caste differentiation in the eusocial wasp *Polistes*. *PLoS ONE*, 6(11): e26641. DOI:10.1371/journal.pone.0026641.
- Jeanne, R.L. (1972). Social biology of the Neotropical wasp *Mischocyttarus drewseni*. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 144: 63–150.
- Keeping, M.G. (2002). Reproductive and worker castes in the primitively eusocial wasp *Belonogaster petiolata* (DeGeer) (Hymenoptera: Vespidae): evidence for pre-imaginal differentiation. *J. Insect. Physiol.*, 48: 867–879. Doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00156-7.
- Liebig, J., Peeters, C., Oldham, N.J., Markstädter, C. & Hölldobler, B. (2000). Are variations in cuticular hydrocarbons of queens and workers a reliable signal of fertility in the ant *Harpegnathos saltator*?. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(8): 4124–4131.  
DOI: 10.1073/pnas.97.8.4124.

- Lockey, K.H. (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Phys.*, 89: 595–645.
- Mateus, S., Noll, F.B. & Zucchi, R. (1997). Morphological caste differences in the Neotropical swarm-founding Polistinae wasp, *Parachartergus smithii* (Hymenoptera, Vespidae). *J. New York Entomol. Soc.*, 105(3-4): 129–139.
- Mateus, S., Noll, F.B. & Zucchi, R. (1999). Caste differences and related bionomic aspects of *Chartergellus communis*, a neotropical swarm-founding polistinae wasp (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini). *J. New York Entomol. Soc.*, 107(4): 391–406.
- Mateus, S., Noll, F.B. & Zucchi, R. (2004). Caste flexibility and variation according to the colony cycle in the swarm-founding wasps, *Parachartergus fraternus* (Gribodo) (Hymenoptera; Apidae: Epipoini). *J. Kansas Entomol. Soc.*, 77(4): 470–483.
- Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann. Zool. Fenn.*, 43(5-6): 515–530.
- Murakami, A.S.N. & Shima, S.N. (2006). Nutritional and social hierarchy establishment of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini) and related aspects. *Sociobiology*, 48: 183–207.
- Murakami, A.S.N., Shima, S.N. & Desuó, I.C. (2009). More than one inseminated female in colonies of the independent-founding wasp *Mischocyttarus cassununga* Von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). *Rev. Bras. Entomol.*, 53: 653–662.  
DOI.org/10.1590/S0085-56262009000400017.
- Neves, E.F., Andrade, L.H.C., Suárez, Y.R., Lima, S.M. & Antonialli-Junior, W.F. (2012). Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genet. Mol. Res.*, 11(3): 1891–1898. DOI: 10.4238/2012.July.19.8.

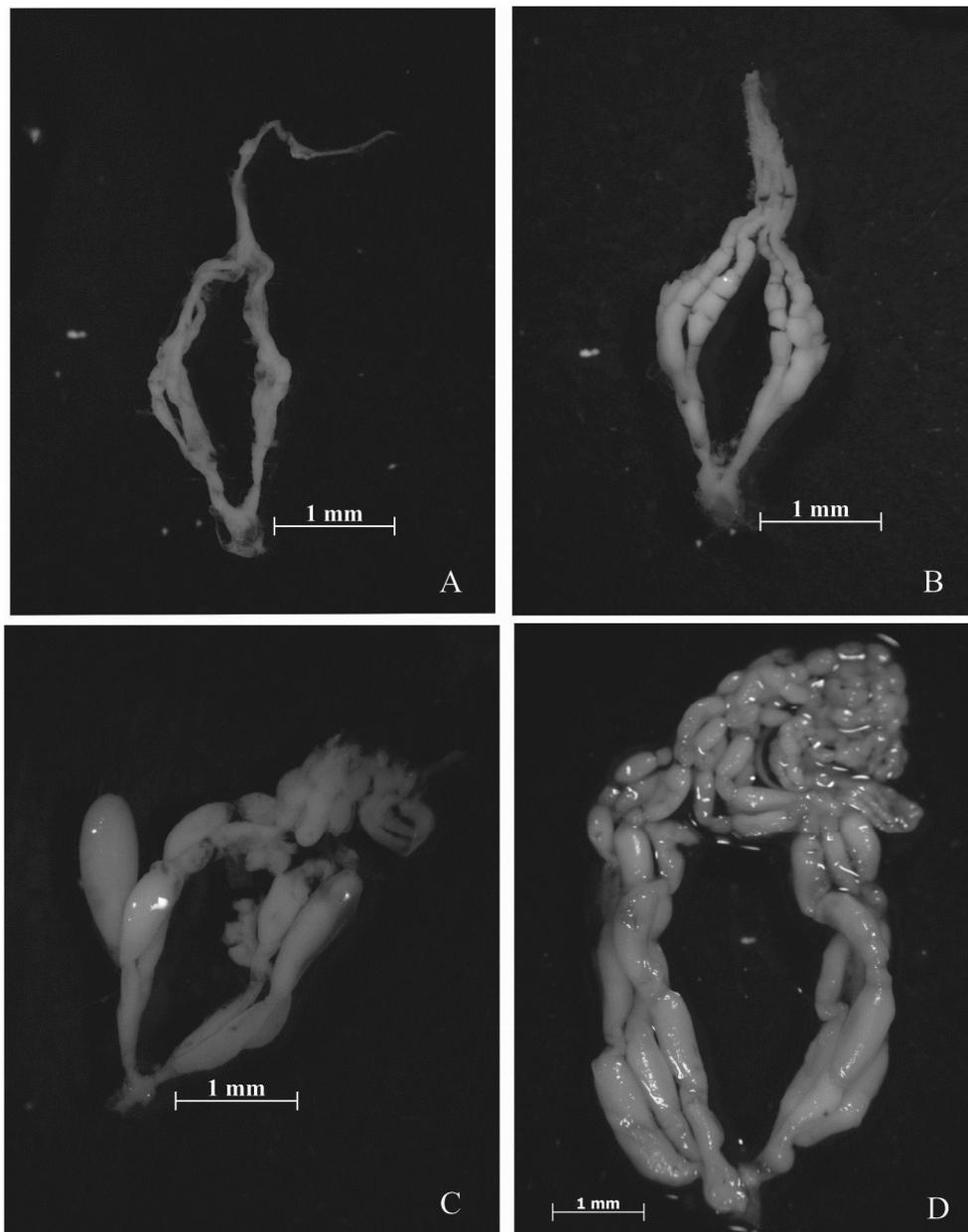
- Noll, F.B., Simões, D. & Zucchi, R. (1997). Morphological caste differences in the neotropical swarm-founding wasps: *Agelaia m. multipicta* and *Agelaia p. pallipes* (Hymenoptera, Vespidae). *Ethol. Ecol. Evol.*, 4(9): 361–372.  
DOI:10.1080/08927014.1997.9522878.
- Noll, F.B., Wenzel, J.W. & Zucchi, R. (2004). Evolution of caste in neotropical swarm-founding wasps (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini). *Am. Mus. Novit.*, 3467: 1–24.
- O'Donnell, S. (1995). Necrophagy by Neotropical swarm-founding wasps (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *Biotropica*, 27: 133–136. DOI: 10.2307/2388911.
- O'Donnell, S. (1998). Dominance and polyethism in the eusocial wasp *Mischocyttarus mastigophorus* (Hymenoptera: Vespidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 43: 327–331. DOI: 10.1007/s002650050498.
- Peeters, C., Monnin, T. & Malosse, C. (1999). Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queen less ant. *P. Roy. Soc B.*, 266: 1323–1327.  
DOI:10.1098/rspb.1999.0782.
- Provost, E., Blight, O., Tirard, A. & Renucci, M. (2008). Hydrocarbons and insects' social physiology. In R.P. Maes (Ed.), *Insect Physiology: new research* (pp. 19–72). Nova Science Publishers.
- Quinn, G.P. & Keough, M.J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Richards, O.W. (1971). The biology of social wasps (Hymenoptera, Vespidae). *Biol. Rev.*, 46: 483–528.
- Robinson, G.E. (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 637–665. DOI: 10.1146/annurev.en.37.010192.003225.

- Röseler, P.F., Röseler, I. & Strambi, A. (1985). Role of ovaries and ecdysteroids in dominance hierarchy establishment among foundresses of the primitively social wasp, *Polistes gallicus*. Behav. Ecol. Sociobiol., 18: 9–13.
- Ross, K.G. & Matthews, R.W. (1991). The social biology of wasps. Ithaca, New York: Cornell University Press.
- Shima, S.N., Yamane, S. & Zucchi, R. (1994). Morphological caste differences in some Neotropical swarm-founding polistine wasps. I. *Apoica flavissima* (Hymenoptera, Vespidae). Jpn. J. Entomol., 62: 811–822.
- Shima, S.N., Noll, F.B., Zucchi, R. & Yamane, S. (1998). Morphological caste differences in the Neotropical swarm-founding Polistine wasps IV. *Pseudopolybia vespiceps*, with preliminary considerations on the role of intermediate females in the social organization of the Epiponini (Hymenoptera, Vespidae). J. Hymenoptera Res., 7: 280–295.
- Shima, S.N., Noll, F.B. & Zucchi, R. (2000). Morphological caste differences in the neotropical swarm-founding polistine wasp, *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae, Epiponini). Sociobiology, 36(1): 41–52.
- Silverstein, R.M. & Webster, F.X. (2000). Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6ª edição. Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro.
- Skoog, D.A., Holler, J.F. & Nieman, T.A. (2002). Princípios de análise instrumental. 5ª edição. Bookman, Porto Alegre.
- Sledge M.F., Boscaro, F. & Turillazzi, S. (2001). Cuticular hydrocarbons and reproductive status in the social wasp *Polistes dominulus*. Behav. Ecol. Sociobiol., 49: 401–409. DOI:10.1007/s002650000311.
- Smith, B.C. (1999). Infrared. Spect. Interpretation: A Syst. Approach. CRC Press, Boca Raton.

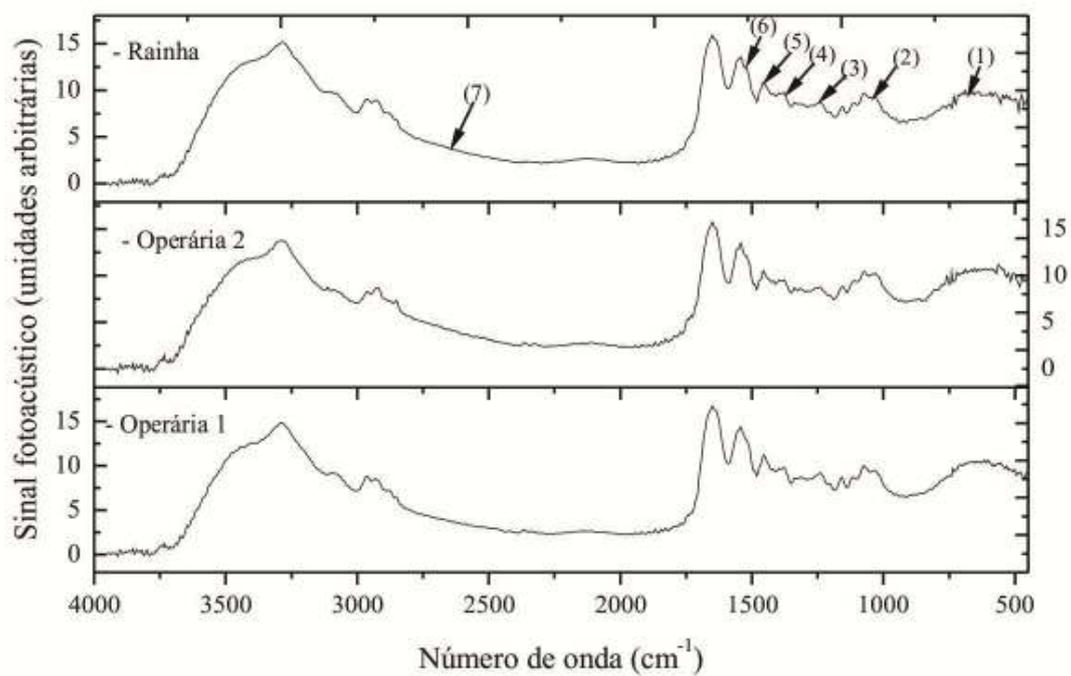
- Strassmann, J.E. & Meyer, D.C. (1983). Gerontocracy in the social wasp, *Polistes exclamans*. *Anim. Behav.*, 31: 431–438.
- Strassmann, J.E., Sullender, B.W. & Queller, D.C. (2002). Caste totipotency and conflict in a large-colony social insect. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.*, 269(1488): 263–270. DOI: 10.1098/rspb.2001.1880.
- Tannure-Nascimento, I.C., Nascimento, F.S. & Zucchi, R. (2005). Size and colony cycle in *Polistes satan*, a Neotropical paper wasp (Hymenoptera, Vespidae). *Ethol.Ecol. Evol.*, 17: 105–119. DOI: 10.1080/08927014.2005.9522601.
- West-Eberhard M.J. (1973). Monogyny in polygynous social wasps. *Proceedings of the VII Congress of I.U.S.S.I. London*,: 396–403.
- Wheeler, D.E. (1986). Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *Am. Nat.*, 128: 13–34.
- Wilson, E.O. (1985). The sociogenesis of insect colonies. *Science*, 228(4704): 1479-148.

**Tabela I.** Número de onda, coeficientes das duas raízes canônicas, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho dos tórax das fêmeas de *Polistes versicolor* para análise do perfil químico da cutícula.

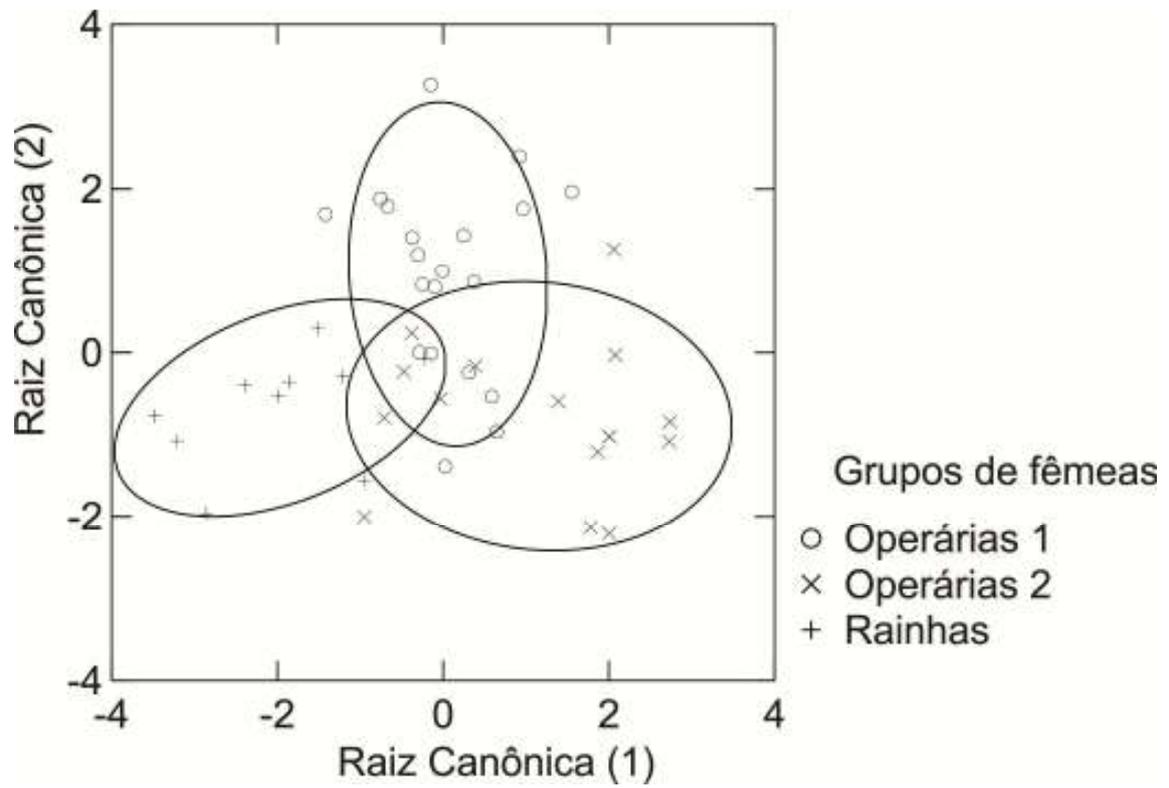
Pico	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Raiz Canônica 1	Raiz Canônica 2	Grupo funcional	Modo vibracional
(1)	667	1.453	3.036	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
(2)	1030	3.185	-5.432	No plano C-H (benzeno)	Dobra
(3)	1238	5.766	-5.481	-C-N	Estiramento
(4)	1377	-15.713	7.655	C-CH <sub>3</sub>	Dobra simétrica
(5)	1450	2.659	1.669	C-CH <sub>2</sub> e C-CH <sub>3</sub>	Dobra assimétrica e tesoura
(6)	1524	3.216	-1.956	N-H	Dobra
(7)	2634	0.173	1.456	C-N e N-H	Dobra de sobreposição



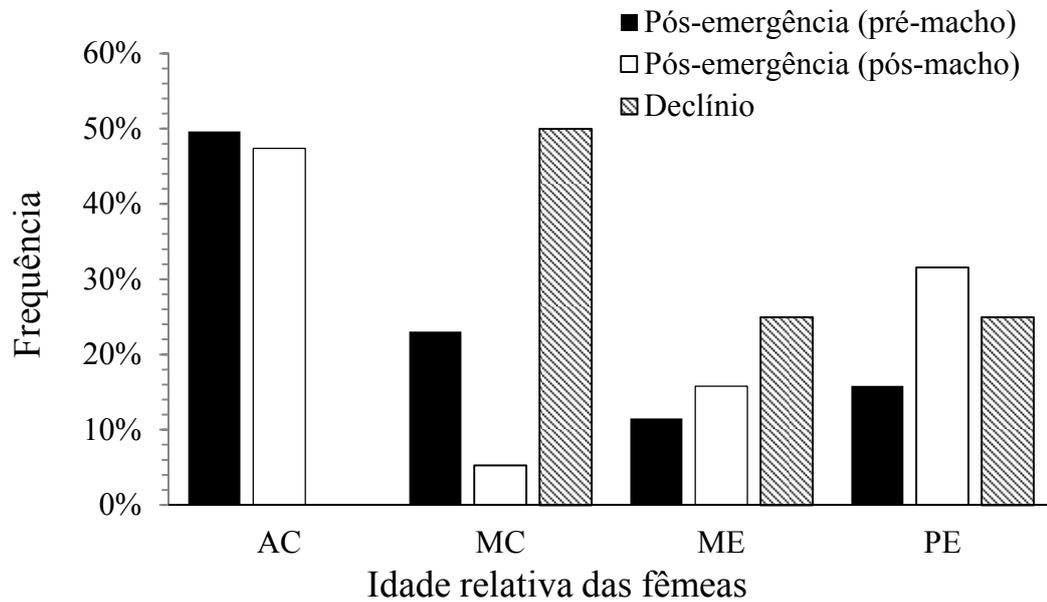
**Figura 1.** Diferentes graus de desenvolvimento ovariano encontrado em fêmeas de *Polistes versicolor*. A) tipo A, ovários filamentosos, que não apresentam oócitos visíveis; B) tipo B, ovários contendo alguns oócitos em início de desenvolvimento; C) tipo C, ovários apresentando oócitos moderadamente desenvolvidos e alguns em fase final de vitelogênese; D) tipo D, ovários longos e bem desenvolvidos, cada um produzindo de dois a vários oócitos.



**Figura 2.** Curva média para cada grupo de absorção no espectro infravermelho médio dos tórax de fêmeas de *Polistes versicolor* agrupadas de acordo com o perfil químico da cutícula, com indicação dos picos significativos para a separação dos grupos.



**Figura 3.** Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas para a diferenciação dos perfis químicos da cutícula em 3 diferentes grupos de fêmeas de *Polistes versicolor*.



**Figura 4.** Frequência da idade relativa de fêmeas de *Polistes versicolor* em dez colônias analisadas de acordo com o padrão de cordo apódema em diferentes estágios do ciclo colonial. AC: amarelo claro; MC: marrom claro; ME: marrom escuro; PR: preto.

### **Considerações finais**

A análise de distância genética gerada pelo método neighbor-joining para as 17 espécies de Polistinae coletadas, mostrou um agrupamento semelhante a trabalhos anteriores, desde as relações entre as tribos até entre subgêneros e espécies. Portanto, sequências do gene COI podem ser utilizadas para identificação e diferenciação entre os táxons de vespas sociais Polistinae.

Já a análise de similaridade obtida do perfil químico da cutícula quando realizada para as 17 espécies não resgatou relações de parentesco congruentes como as observadas em trabalhos de filogenia. Contudo, ao analisar apenas as seis espécies com maior amostragem de colônias de diferentes populações foi possível observar a separação das três tribos analisadas: Epiponini, Mischoctytarini e Polistini e suas respectivas espécies. Esta relação fica evidente ao realizar o teste de mantel que aponta correlação significativa entre as matrizes do gene COI e do perfil químico da cutícula.

Portanto, os resultados apresentados aqui, permitem inferir que as relações geradas pela variação dos perfis químicos da cutícula entre espécies, bem como de suas sequências genéticas podem atuar de forma complementar como ferramentas taxonômicas. Além disso, no caso dos compostos cuticulares o efeito do ambiente deve ser levado em conta e seus efeitos devem ser diluídos pela análise de um número substancial de colônias de uma mesma espécie de diferentes locais e ambientes.

Com relação ao perfil químico do substrato do ninho, pode-se concluir que os elementos presentes na cutícula do adulto e no substrato são semelhantes, uma vez que cada colônia possui um perfil químico característico. Além disso, é possível afirmar que o perfil químico do ninho pode ser utilizado como uma ferramenta complementar para análises de relações intra e interespecíficas em vespas sociais e que as análises

populacionais mostram variação no perfil químico do substrato dos ninhos de acordo com o tipo de ambiente em que as colônias nidificam.

Para os fatores que indicam o status reprodutivo, tanto de *Polistes ferreri* quanto de *Polistes versicolor* pode-se concluir que há três grupos de fêmeas com diferentes perfis químicos cuticulares: o primeiro grupo é de fêmeas com ovariolos filamentosos, típico de operárias; o segundo, fêmeas com ovariolos parcialmente desenvolvidos; e o terceiro é o grupo das rainhas, as quais estão entre as fêmeas mais velhas, são inseminadas e apresentam maior grau de desenvolvimento ovariano entre todas as fêmeas. Além disso, apesar de não haver diferenças morfológicas entre as fêmeas, ao analisar a composição química da cutícula, a inseminação e a idade relativa, pode-se inferir o status reprodutivo ocupado por cada fêmea na colônia.

Por fim, pode-se concluir que a técnica FTIR-PAS mostrou-se altamente eficiente para a separação entre os grupos analisados, seja para o perfil químico dos indivíduos adultos, para o perfil químico do substrato dos ninhos ou para a relação entre a posição fisiológica reprodutiva da fêmea e seu perfil químico cuticular.

# SOCIOBIOLOGY: Author Guidelines

## SECTION I - Manuscript preparation

### 1- Manuscript file formatting

All manuscripts submitted to Sociobiology must be written in English, with clarity and readability in mind. Manuscripts are subject to editing to ensure conformity to editorial standards and journal style.

- Submit manuscript as an MS Word or RTF file with a page size Letter, 8.5 x 11".
- Use continuous line numbering on all pages of your manuscript.
- Type all as double-spaced, with 1-inch margins, and do not right justify text.
- Use the font Times (New) Roman with a size of 12 point.
- Left-justify the title, author line, affiliation lines, subheadings, text, and References Cited.
- Insert tabs, not spaces, for paragraph indents.
- Use italicization only to indicate scientific names (including viruses), symbols or variables, and words that are defined.
- Use quotation marks for quoted material only.
- Use American English spelling throughout and follow Merriam-Webster's New Collegiate Dictionary, 10th ed., for guidance on spelling.
- Number pages consecutively, beginning with the title page.
- Lines in the manuscript must be numbered.
- Begin each of the following on a separate page and arrange in the following order: title page, abstract and key words (three to six words), manuscript text, acknowledgments, references cited, footnotes, tables, figure legends, and figures.
- Type all captions on a separate page and put each figure and table on a separate page.
- **Make sure the file size (in Word, Libre Office or TRF format) does not exceed 2MB.** This is the maximum upload file size in the OJS setup. If the manuscript is larger than that due to figures of high resolution, leave only figure legends in the manuscript file. Prepare figures in JPG or GIF format with size up to 2MB and upload individual figures as supplementary files. During the upload of supplementary files, in step 4, name the files with titles corresponding to the number of figures in the manuscript text. Check the option "Present supplementary files to reviewers".
- The sequence to correctly upload files in steps 2 (original article) and 4 (supplementary files) of the electronic submission is to choose the file (OJS will access your File Manager program), to click the Upload button, and then click the button "Save and continue". Upload as many supplementary files as needed repeating this sequence. After you are finished with the uploads, click "Save and continue". You will reach step 5 "Confirmation". Click the button "Finish Submission".

### 2- Manuscript Preparation Instructions

#### 2.1- Front page

Justify the complete name and the regular and electronic mail addresses of corresponding author on the upper right of the page.

Center-justify the title using capital initials (except for prepositions and articles).

Scientific names in the title must be followed by the author's name (without the year) and by the order and family names in parentheses.

Author(s) name(s) should be center-justified below the title using small capital letters. Only initials of the first and middle names of authors shall be provided, followed by the family names in full.

Names of different authors are separated by commas, without the use of "and" or "&" (Examples: RJ GUPTA; LG SIMONS, F NIELSEN, SB KAZINSKY).

Skip one line and list each authors' affiliation identified by call numbers whenever more than one address is listed.

Skip another line and provide a running title, no longer than 60 characters.

#### 2.2 - Page 2 – Abstract

The abstract must be easy to understand and not require reference to the body of the article. Only very important results must be presented in the abstract; it must not contain any abbreviations or statistical details. Type ABSTRACT followed by a hyphen and the text. The abstract must be one-paragraph long and not exceed 250 words. Skip one line and type Keywords. Type three to five keywords separated by commas, preferably ones not present in the title.

#### 2.3 - Main Text

**Introduction** - This section of the manuscript must clearly contextualize the research problem and state the scientific hypothesis being tested, as well as the research objectives.

**Material and Methods** - This section must provide enough information for the research to be replicated. Please include the statistical design and, if necessary, the name of the program used for analysis.

**Results and Discussion** - This section can be grouped or kept as separate sections. In Results, mean values must be followed by the mean standard error and the number of observations. Use

two decimals for mean values and for standard errors. Articles for which Analysis of Variance was performed shall present an ANOVA table containing sources of variation, DF, SS, F statistics and P-value.

Conclusions must be stated at the end of discussion.

**Acknowledgments** - The text must be concise and contain the recognition to people first, and then institutions and/or sponsors.

**References** - Under the section title, type the references, in alphabetical order, one per paragraph, with no space between them.

- The authors' family names are typed first in full, followed by capital initials, followed by period.
- Use a comma to separate the names of authors.
- Add the reference year after the authors' family name, between parentheses.
- Abbreviate the titles of the bibliographical sources, starting with capital letters. Use journal abbreviations according to the ISI journal abbreviations list <http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISIabbr/>
- Please avoid citations of dissertations, theses, and extension materials. Do not cite monographs, partial research reports, or abstracts of papers presented at scientific meetings.
- Whenever possible type the DOI number at the end of the reference. Most articles published in the 2000's have a DOI number.

Examples of reference style:

**Book**

Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990). *The Ants*. Cambridge: Harvard University Press, 732 p

**Chapter or article in an edited book**

Cushman, J.H. & Addicott, J.F. (1991). Conditional interactions in ant-plant-herbivore mutualisms. In C.R. Huxley & D.F. Cutler (Eds.), *Ant-plant interactions* (pp. 92-103). Oxford: Oxford University Press.

**Chapter or article in an edited book, online**

Author, A. (year). Title of book. [details about the format if available].

**Retrieved from web address or DOI Journal article**

Bolton, B. (2011). Catalogue of species-group taxa. <http://gap.entclub.org/contact.html>. (accessed date: 1 March, 2011).

Matsuura, K., Himuro, C., Yokoi, T., Yamamoto, Y., Vargo, E. L. & Keller, L. (2010). Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 107: 12963-12968. doi: 10.1073/pnas.1004675107

- The issue number should be indicated only if each issue of a journal begins on page 1.
- Capitalise only the first letter of the first word of an article title and subtitle, and any proper nouns.
- Capitalise the first letter of every main word in the journal title.
- Include a digital object identifier (DOI) if provided

**Journal article, online**

Liu, N., Cheng, D.M., Xu, H.H. & Zhang, Z.X. (2011). Behavioral and Lethal Effects of  $\alpha$ -terthienyl on the Red Imported Fire Ant (RIFA). *Chin. Agri. Sci.*, 44: 4815-4822. Retrieved from: [http://211.155.251.135:81/Jwk\\_zgnykx/EN/Y2011/V44/I23/4815](http://211.155.251.135:81/Jwk_zgnykx/EN/Y2011/V44/I23/4815)

**Group or organisation as author**

Organisation Name. (Year). Details of the work as appropriate to a printed or electronic form.

**Tables**

Tables must be placed separately, one per page, after the References section. Please number tables consecutively with Arabic numbers at the same order they are referred to in the text. Footnotes must have call numbers. Use the word "Table" in full in the text (example: Table 1).

Example of a table title:

Table 1. Frequency of the four types of ovaries within the colonies of *Angiopolibia pallens*.

**Figures**

Insert the list of figures after the tables. Use the abbreviation "Fig" in the titles and in the text (such as Fig 3). Figures must be in jpg or gif format, according to the following guidelines:

Use JPEG for photographs and images of realistic scenes

Generally speaking, JPEG is superior to GIF for storing full-color or grey-scale images of "realistic" scenes; that means scanned photographs and similar material. Any continuous variation in color, such as occurs in highlighted or shaded areas, will be represented more faithfully and in less space by JPEG than by GIF.

JPEG has a hard time with very sharp edges: a row of pure-black pixels adjacent to a row of pure-white pixels, for example. Sharp edges tend to come out blurred unless you use a very high quality setting. Edges this sharp are rare in scanned photographs, but are fairly common in graphics files: borders, overlaid text, etc. The blurriness is particularly objectionable with text

that's only a few pixels high. If you have a graphics with a lot of small-size overlaid text, don't JPEG it, save it as GIF.

Use GIF for black and white, simple line and text graphics.

GIF is the abbreviation for Graphics Interchange Format. The images saved in this format lose a lot of color information by being reduced to 256 colors (8 bits per pixel). That makes it not such a good format for photographs and large images but ideal for storing graphics with a limited number of colors such as line and bar graphics, simple drawings, logos, text, diagrams, small images or pictures in greyscale.

. Use original or high resolution figures (with a minimum resolution of 300 dpi). Whenever possible, graphs shall be prepared in MS Excell or a similar/compatible open source program.

Example of a figure title:

Fig 1. Nest of *Angiopolibia pallens*. A – General view of a nest. B – The combs suspended from those above by pedicels. The large arrow indicates the main pedicel, the small one indicates an auxiliary pedicel.

### 3- In-text Citations

#### **Scientific names**

Write the scientific names in full, followed by the author's family name, when they are first mentioned in the Abstract and in the body of the text, e.g.: *Polistes canadensis* (L.). Use the abbreviated generic name (e.g.: *P. canadensis*) in the rest of the manuscript, except in tables and figures, where the species name shall be typed in full.

#### **One author**

When you refer to a single author, include the author's family name and year of publication, using one of the forms shown here.

Ginsberg (2005) argues that local diversity of bees is driven by species selection from a regional diversity pool. or

Local diversity of bees is driven by species selection from a regional diversity pool (Ginsberg, 2005).

#### **Multiple authors**

For two authors, include the family names of both authors and year.

According to Smith and Velasquez (2009) chaparrals are a source of endemism for ants in the Venezuelan Andes. or

Chaparrals are a source of endemism for ants in the Venezuelan Andes (Smith & Velasquez, 2009).

Use 'and' when family names are outside parentheses; use '&' when family names are inside parentheses.

In the case of three or more authors, cite first authors' family name, plus 'et al.' and the year.

#### **Multiple references**

If more than one reference has to be cited, follow the chronological order of publication, separated with semicolons (for example: Xia & Liu, 1998; Saravanah, 2003; Balestreri, 2006; Ustachenko et al., 2010). Use 'and' when family names are outside parentheses; use '&' when family names are inside parentheses.

#### **Secondary source**

Some citations refer to one author (secondary) who cites another (primary).

Yamamoto (as cited in Harvey, 2010) disagrees with the taxonomic review of the genus *Camponotus* presented by Gold (2008).

Note: The entry in the reference list is under Harvey.

#### **Article or chapter in an edited book**

If a chapter or article written by a contributor author to an edited book has to be cited, acknowledge the author of the chapter or article. This author is cited in text (that is, in the body of the paper) in the same way as for one or more authors.

#### **Group or organisation as author**

Whenever the author is a government agency, association, corporate body or the like, which has a familiar or easily understandable acronym, it is cited as follows:

The reduction of industry polluting particles in Cleveland resulted in the increase of bee species richness in park areas in the 1990's (Environmental Protection Agency [EPA], 2006).

Note: The entry in the reference list is under Environmental Protection Agency.

#### **Personal communication**

Personal communications are understood as letters, e-mails, personal interviews, telephone conversations and the like. They must be in text only and are not included in a reference list.

J. Ahmed (personal communication, May 11, 2010) indicated ...

... (L. Stainer, Senior Researcher, Social Insects Study Centre, personal communication, June 4, 2009)

#### 4 - Scientific Notes

Manuscripts that report new geographic occurrences, trophic interactions or new methods for the study of social insects can be submitted. But records of species or host associations to new localities in geographical regions that they are already known are no longer accepted for publication. Records of species or associations known to a geographical region may be considered only if including new ecological zones.

Distribution records must not be based on political borders, but on ecosystems.

Manuscript requirements are the same as for scientific articles. However, Introduction, Material and Methods, and Results and Discussion are written without subtitles. The abstract must have up to 100 words and the text no longer than 1,000 words. Figures or tables can be included if highly necessary, but not exceed the limit of two figures or tables per note.

## **SECTION II - Important reminders on submission process**

#### 6 - Fill in Metadata Forms

It is important to fill in all metadata forms with an asterisk (mandatory fields) during the five steps of the submission process. Additionally, please include metadata on all authors that appear in the manuscript. The first field that appears can be filled in with submitter metadata, and by clicking the button "Add author" new forms will appear for as much authors as needed. Author metadata is important for abstracting and indexing purposes. Remember that in modern days indexing agencies have online data harvesters. Any omission or lack of accuracy in authors, disciplines and keywords metadata can affect the visibility of authors work.

#### 7 - List of Potential reviewers

Put together a list of four potential referees (with a PhD or Doctor of Science degree) that you will inform in the text box "Comments to the Editor" during the submission process. In the list you must provide the complete name, Institutional Affiliation, Country, e-mail address and three key words that best describe the area of expertise of each potential referee. At least two referees must be from countries different from the author's country of origin.

#### 8 - Journal Access

Accepted manuscripts will be published free of charges and fees, reprints will not be provided. The authors and the general public will have full online access to PDF files of all published articles.

#### **Further Information:**

Gilberto Marcos de Mendonça Santos  
Universidade Estadual de Feira de Santana  
Av. Transnordestina s/n Novo Horizonte  
Feira de Santana – BA Brazil  
44036-900  
E-mail: sociobiology.gmms@uefs.br

## **Submission Preparation Checklist**

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. The submission has not been published, nor is it before another journal for consideration (or an explanation has been provided on Comments to the Editor).
2. The file is in Microsoft Word, LibreOffice or RTF document file format.
3. URLs and/or DOI numbers for the cited references are provided in the "References" section whenever possible. THE ABSENCE OF DOIs CAN RESULT IN IMMEDIATE REJECTION OF SUBMISSION.
4. Tables and pictures are inserted at the end of the Microsoft Word, LibreOffice or RTF file. Furthermore, pictures for definitive editing are prepared in separate .jpg or .gif files with at least 300 dpi resolution.
5. All in-text citations have their corresponding references listed in the reference section. References are in accordance with [Author's Guidelines](#). REFERENCES OUT OF REQUIRED FORMAT CAN RESULT IN IMMEDIATE REJECTION OF SUBMISSIONS.
6. You have put together a list of four potential referees (with a PhD or Doctor of Science degree) that you will inform in the text box "Comments to the Editor". In the list you have the complete name, Institutional Affiliation, Country, e-mail address and three key words that best describe the area of expertise of each potential referee. At least two referees must be from countries different from the author's country of origin.