

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**Varição Intra e interespecífica na composição de hidrocarbono  
cuticular da vespa *Mischocyttarus consimilis* por FTIR-PAS**

Dourados/MS

Março de 2011

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**Variação Intra e interespecífica na composição de hidrocarbono  
cuticular da vespa *Mischocyttarus consimilis* por FTIR-PAS**

Erika Fernandes Neves

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior

Dourados/ MS

Março de 2011

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)  
Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade

**Variação Intra e interespecífica na composição de hidrocarbono  
cuticular da vespa *Mischocyttarus consimilis* por FTIR-PAS**

Erika Fernandes Neves

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Entomologia e Conservação da Biodiversidade.

Dourados/MS

Março de 2011

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD**

595.798      Neves, Erika Fernandes.  
N518v          Variação Intra e interespecífica na composição de hidrocarbono cuticular da vespa *Mischocyttarus consimilis* por FTIR-PAS / Erika Fernandes Neves – Dourados, MS : UFGD, 2011.

83f

Orientador: Prof. Dr. William Fernando Antonialli-Junior

Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Vespas – Comportamento. 2. Insetos himenópteros. I. Título.

“Variação intra e interespecífica na composição de hidrocarbono cuticular da vespa  
*Mischocyttarus consimilis* por FTIR-PAS”

Por

**ÉRIKA FERNANDES NEVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
**MESTRE EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE**  
Área de Concentração: Entomologia



Prof. Dr. William Fernando Antonialli Júnior  
Orientador - UEMS



Prof. Dr. Valter Vieira Alves Júnior  
Membro Titular – UFGD



Prof. Dr. Sandro Márcio Lima  
Membro Titular – UEMS

Aprovada em: 28 de Fevereiro de 2011

*"É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático, como os pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem, que não conhecem a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros.*

*Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante ele, por terem apenas passado pela vida."*

*Bob Marley*

## **Agradecimentos**

Toda lista de agradecimentos eventualmente peca pela ausência de uma ou outra pessoa que teve papel, ainda que pequeno, na conclusão de um trabalho como este. Mesmo assim, arrisco-me a relacionar os nomes de alguns que participaram dessa jornada comigo, ou antes dela forneceram-me os meios para a travessia.

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me guiar e dar força para seguir em frente mesmo nos momentos mais adversos;

À minha família, pela formação que me permitiu ter, com os sacrifícios que só ela sabe quais foram e pelo incentivo de sempre continuar estudando;

Ao meu orientador Prof. Dr. William Fernando Antonialli Junior, que gentilmente aceitou me orientar mesmo sem me conhecer, e como ele mesmo disse foi um “tiro no escuro”, agradeço pela sua paciência, amizade, incentivo e sabedoria que tem me transmitido sem medir esforços;

Ao Professor Dr. Luiz Humberto da Cunha Andrade que desde o começo me orientou, na coleta dos dados, pela sua imensa paciência, sabedoria e generosidade em sempre me receber e incentivar nesse trabalho, e ao Professor Dr. Yzel Rondon Suarez que sempre me ensinou e auxiliou na análise estatística, sem eles não seria possível a realização desse trabalho;

Aos professores Dr. Valter Alves Vieira Junior, o professor Dr. José Benedito Perella Balestiere, e ao professor Dr. Sandro Lima, pela disponibilidade, gentileza, de participarem da minha banca dando contribuições valiosas para esse trabalho.

A todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado durante essa caminhada, em especial a Charlotte Cerqueira Soares, Samir de Oliveira Kassab, Thiago Alexandre Mota, e a Aline Câmara Zampieri, que sempre estiveram presentes nos bons e maus momentos desde a graduação.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e incentivo sempre, em especial a Viviana de Oliveira Torres e ao Thiago dos Santos Montagna pela amizade e por me ajudarem na coleta e discussão dos dados.

Ao Programa de Pós Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade pela Bolsa de mestrado e pela orientação sempre que necessário.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul pelo apoio técnico.

Ao Fundect pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na elaboração dessa dissertação. Muito Obrigada!

## Índice

Introdução Geral .....Página: 11

Referências Bibliográficas .....Página: 21

### Capítulo I

Estudo da variação do perfil de hidrocarbono cuticular e aquisição da assinatura química colonial de adultos da vespa *Mischocyttarus consimilis* Zikán, 1949 (Hymenoptera: Vespidae)

Resumo .....Página: 25

Abstract .....Página: 26

Introdução .....Página: 27

Materiais e métodos .....Página: 28

Resultados e discussão .....Página: 30

Referências bibliográficas .....Página: 39

### Capítulo II

Diferenciação intra-específica pelo perfil de hidrocarbono cuticular na vespa *Mischocyttarus consimilis* Zikán, 1949 (Hymenoptera: Vespidae) por FTIR-PAS

Resumo .....Página: 42

Abstract .....Página: 43

Introdução .....Página: 44

Materiais e métodos .....	Página: 45
Resultados e discussão .....	Página: 47
Referências bibliográficas .....	Página: 53

### **CAPÍTULO III**

O papel do perfil de hidrocarbono cuticular de *Mischocyttarus consimilis* como estratégia para parasitar colônias de *Mischocyttarus cerberus*

Resumo .....	Página: 58
Abstract .....	Página: 59
Introdução .....	Página: 60
Materiais e métodos .....	Página: 62
Resultados e discussão .....	Página: 64
Referências Bibliográficas .....	Página: 71
Considerações Finais .....	Página: 77

#### Anexos

Instruções para o envio dos manuscritos à revista científica.....	Página: 78
---	------------

## **Introdução geral**

Nas sociedades de insetos os indivíduos vivem em uma complexa organização, com divisões de trabalho pré-estabelecidos, de acordo com castas definidas, na qual um indivíduo não pode viver fora da colônia em que se desenvolveu (Ruppert et al. 2005).

Para o desenvolvimento das diversas tarefas nas colônias os insetos sociais desenvolveram mecanismos de comunicação química e neste contexto os receptores olfativos são amplamente utilizados nesse processo (Ferreira-Caliman et al. 2007). Estes compostos, denominados feromônios agem no indivíduo receptor, como gatilhos fisiológicos de reações comportamentais específicas. Em uma nomenclatura mais generalista, estas substâncias são denominadas de semioquímicos. É através da detecção e emissão destes compostos que os insetos encontram parceiros para o acasalamento, alimento ou presa, escolhem local de oviposição, se defendem contra predadores e organizam suas comunidades, no caso dos insetos sociais (Leal 2005).

Entre os insetos, diferentes tipos de feromônios são reconhecidos através dos comportamentos que estes compostos produzem no receptor da mensagem. Os comportamentos mais comuns mediados por feromônio são: a atração de indivíduos do sexo oposto para acasalamento, denominados de feromônios sexuais; a agregação de indivíduos de ambos os sexos para um local específico para alimentação e/ou de acasalamento, através de feromônios de agregação; a demarcação de espaço ou formação de trilhas, comportamento comum em formigas, através de feromônios classificados como de marcação ou trilha. Além destes, os insetos sociais utilizam uma variedade de feromônios para organizar as atividades na colônia (Jurenka 2004).

Dessa forma os feromônios executam uma função chave em muitos aspectos da vida de um inseto e são geralmente divididos em dois tipos: substâncias leves e voláteis secretadas por glândulas e cadeias de hidrocarbonos encontradas na cutícula (Howard 1993).

Os hidrocarbonos cuticulares (HC) estão agrupados numa classe de compostos voláteis conhecidos como “feromônios de superfície”. Estes feromônios são importantes para os insetos sociais, por permitirem o reconhecimento dos membros da mesma espécie, além do reconhecimento dos ninhos, e até mesmo, membros de diferentes castas. Geralmente, os feromônios aparecem absorvidos pela superfície do corpo e são percebidos por outros insetos, por meio de distâncias pequenas ou podem ser detectados por contato direto (Abdalla et al. 2003). Esses são compostos geralmente relacionados à identificação dos papéis dos indivíduos dentro da colônia, ou seja, a qual casta pertence, quais são os indivíduos geneticamente relacionados, qual a sua função na colônia e outras questões comportamentais (Singer et al. 1998).

Assim, os hidrocarbonos presentes na cutícula constituem o grupo de compostos químicos de importância fundamental para a sinalização intra e inter-colonial formando uma identidade química específica para cada colônia (Ferreira-Caliman et al. 2007). Além da função de proteger a cutícula e conseqüentemente o animal como um todo da desidratação (Lockey 1988).

A organização social das colônias dos insetos indica a importância de informações que normalmente não é necessário em insetos solitários como por exemplo, a presença e a fertilidade de uma rainha afeta fortemente o comportamento de operárias na organização da colônia. A concorrência reprodutiva em colônias exige uma correta avaliação da posição de cada indivíduo. Todas essas informações sobre o estado de fertilidade e/ou o status de dominância pode ser codificado no perfil de HC de formigas, vespas, e em colônias de abelhas (Liebig 2010).

Em abelhas, por exemplo, o perfil de hidrocarbono é em parte, geneticamente determinado, diferindo entre subfamílias, sugerindo que sejam utilizados pelas operárias como "assinaturas" para seu reconhecimento (Arnold et al. 2000). A respeito disto, constatou-se que os

indivíduos das colônias da vespa *Polistes fuscatus* emergem sem o perfil de hidrocarbono característico de sua colônia, que passa a ser adquirido em alguns dias, pela ativação de genes, sendo não mais aceitas por indivíduos de outras colônias (Panek et al. 2001).

Já estudos com formigas como o de Locher et al. (2009) com *Ectatomma brunneum* concluíram que as operárias ao limparem os recém-emergidos, lambendo-os, podem transmitir, nesse momento, o odor da colônia para esses indivíduos. De fato, Panek et al. (2001) sugere que os indivíduos recém-emergidos da espécie *Polistes fuscatus* nascem sem assinatura da colônia, obtendo-a algumas horas após a sua emergência, podendo ser esse, um indício de que talvez ao serem lambidos esses insetos passem a apresentar a assinatura característica de sua colônia.

Durante os últimos anos, numerosos trabalhos têm explorado o mecanismo de reconhecimento dos indivíduos nas colônias de diversos insetos sociais (Panek et al. 2001). Já foram descritos, por exemplo, que em muitas espécies, os HC dos adultos variam de acordo com a colônia, a fisiologia (Blomquist et al. 1998; Lenoir et al. 1999) e entre castas, como na abelha *Melipona bicolor* (Abdalla et al. 2003) e na formiga *Ectatomma vizottoi* (Antoniali-Junior et al. 2007). Contudo, estudos de perfis de HC em vespas são bastante recentes, destes as espécies mais estudadas tem sido, ainda, do gênero *Polistes*. Em *P. dominulus*, por exemplo, (Cotoneschi et al. 2009) foi observado a possibilidade das operárias distinguirem o sexo de seus companheiros de ninho através do HC, em *P. biglumis bimaculatus* (Lorenzi et al. 1997) a capacidade de reconhecimento intra-específico, em *P. fuscatus*, o momento em que é adquirido a assinatura colonial (Panek et al. 2001), e ainda, constatou-se que *P. semenowi* imita o odor de *P. dominulus* para invadir a colônia hospedeira (Lorenzi et al. 2004).

Algumas técnicas têm sido utilizadas para avaliar os perfis de hidrocarbono cuticulares em insetos sociais, sendo uma das mais recentes, a cromatografia gasosa (Dietermann et al. 1992), que apesar de ser uma técnica muito confiável e capaz de fornecer boas análises

quantitativas, requer diversas etapas de preparação de amostras, e dependendo da amostra pode demorar na obtenção de resultados além de ser destrutível. Recentemente tem sido 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”), para estudo da distinção de castas e sexo (Antoniali- Junior et al. 2007) e também de espécies de formigas (Antoniali-Junior et al. 2007, 2008).

A técnica (FTIR-PAS) é uma medida da radiação absorvida pela amostra, suas vantagens são muito interessantes para sua aplicação em materiais de grande fragilidade, como materiais biológicos, devido à intensidade da radiação ser baixa não provoca a destruição da amostra. Além disso, pode ser empregada em medidas de amostras com dimensões reduzidas (Greene et al. 1992).

Além dessas características, o aparelho utilizado, espectrofotômetro com transformada de Fourier (Fig.1), 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 (Greene et al. 1992). Esta técnica já foi empregada com sucesso na análise 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), foi também empregada para distinção de castas de insetos sociais (Antoniali- Junior et al. 2007), na distinção entre as variedades convencionais e transgênicas de soja (Caires et al. 2008) e também na detecção da ferrugem asiática nas folhas de soja infectadas com o fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Andrade et al. 2008). É uma técnica universal capaz de ser empregada em vários materiais como, sólidos, líquidos, gases, pó e polímeros podem ser analisados. De modo geral, para análise de muitos materiais, a técnica de espectroscopia infravermelha é relativamente rápida, de fácil manuseio, possui alta sensibilidade e boa resolução (Skoog et al. 2002).

A espectroscopia óptica é realizada na região espectral do infravermelho médio compreende a faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  (Skoog et al. 2002; Silverstein et al. 2000). 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, sendo este, o aspecto mais vantajoso dessa técnica (Smith 1999).

As posições dos átomos que compõe uma molécula não são fixas e podem variar de acordo com as vibrações e rotações que ocorrem na molécula, quando a frequência incidida corresponde à frequência de vibração da mesma (Andrade et al. 2008). Estas vibrações moleculares podem ser de estiramento ou de dobra. A Figura 2 mostra um exemplo de vibração de estiramento cuja variação periódica da distância interatômica entre os átomos causa um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação, que pode ser simétricas ou assimétricas (Smith 1999, Barbosa 2007, Andrade et al. 2008).

As vibrações de dobra (Fig. 3) caracterizam-se pela variação ritmada do ângulo entre duas ligações, sem que a posição relativa dos átomos se altere. Estas vibrações de deformação angular podem ser de quatro tipos: tesoura, balanço, agitação e torção (Smith 1999, Barbosa 2007, Andrade et al 2008).

Para as análises de HC em *Mischocyttarus consimilis* o FTIR-PAS foi realizado diretamente no gáster (Fig. 4), por ser a região de maior concentração dos HC (Cuviller-Hot et al. 2001). Para isso os gásteres foram extraídos e depositados separadamente em placas de petri (Fig. 4). Em seguida, foram colocados em estufa à vácuo por 48 horas para minimizar a umidade, que interfere no espectro (Fig. 5).

Um espectro de referência de corpo negro (background) obtido de uma amostra de carbono foi coletado para a normalização da intensidade espectral. Logo após, espectros de absorção óptica no infravermelho médio (região entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ ) foram realizado nas vespas para análise de HC (Fig. 6).

Os gásteres foram então colocados no suporte característico da célula fotoacústica e purgados com gás hélio (Fig. 7), que tem como finalidade maximizar o sinal fotoacústico, além de, remover o CO<sub>2</sub> e vapor de água do interior do espectrofotômetro (Gordon et al 1997).

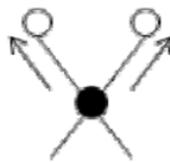
Os dados foram processados com o Software Omnic fornecido pelo próprio fabricante do equipamento. Os gráficos foram gerados e processados com auxílio de programas gráficos. Devido a intensidade de o sinal fotoacústico ser em unidades arbitrárias, os gráficos gerados após a plotagem foram normalizados a partir do valor da área de cada espectro. A partir de todos os espectros foram separadas as linhas de absorção entre 400 e 4000 cm<sup>-1</sup> que apresentam as informações que se pretendeu analisar.

Posteriormente os dados foram submetidos à Análise de Função Discriminante ou Análise de variáveis Canônicas, para indicação da possível separação dos grupos analisados. A distribuição multivariada é especificada por um vetor de médias, que contém os valores médios para todas as variáveis consideradas, e uma matriz de covariâncias, as quais medem o quanto todos os pares de variáveis estão relacionados (Manly, 2008). A eficiência no método de várias variáveis, utilizadas no processo de “discriminação” dos grupos definidos é calculada a partir da estatística Wilk’s lambda. O estimador Wilk’s lambda varia entre 0 e 1, sendo que valores próximos a zero ocorrem quando os grupos são facilmente diferenciados entre si, por outro lado, se o valor de Wilk’s lambda for próximo de um os grupos são muito sobrepostos, ou seja, não são diferenciáveis por meio das variáveis utilizadas (Manly 2008).

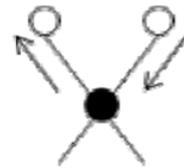


**Figura 1.** Espectrofotômetro infravermelho utilizado na análise de HC por FTIR-PAS.

Vibrações de Estiramento:



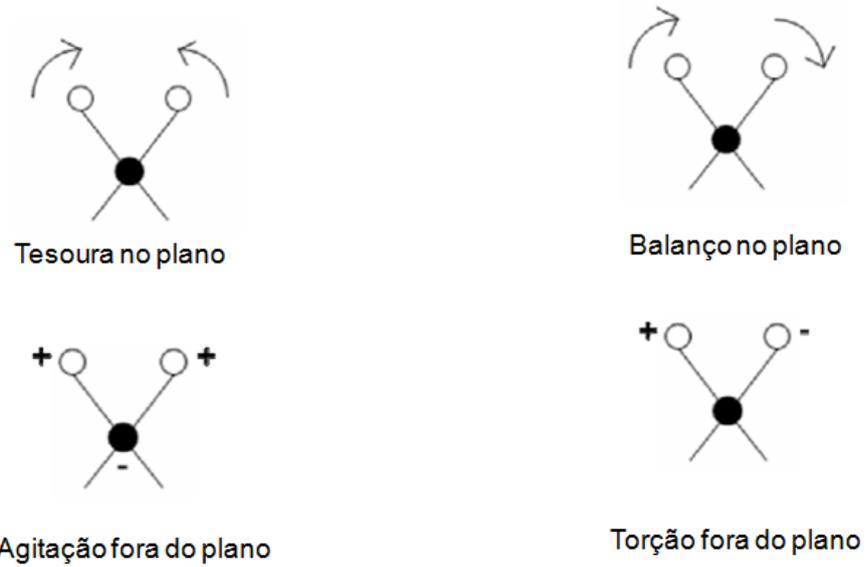
Simétrico



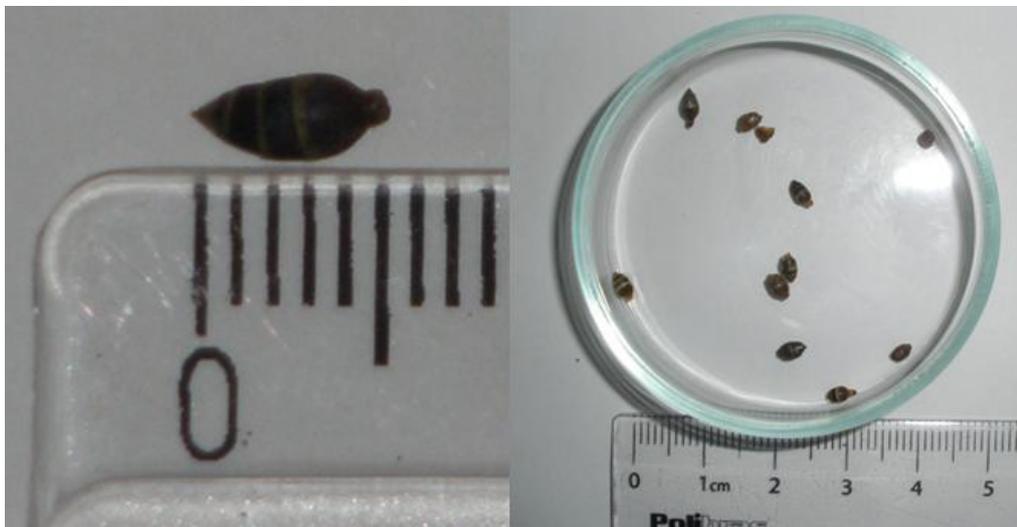
Assimétrico

**Figura 2.** Ilustrações das vibrações de estiramento do tipo Simétrico e Assimétrico.

### Vibrações de Dobra:



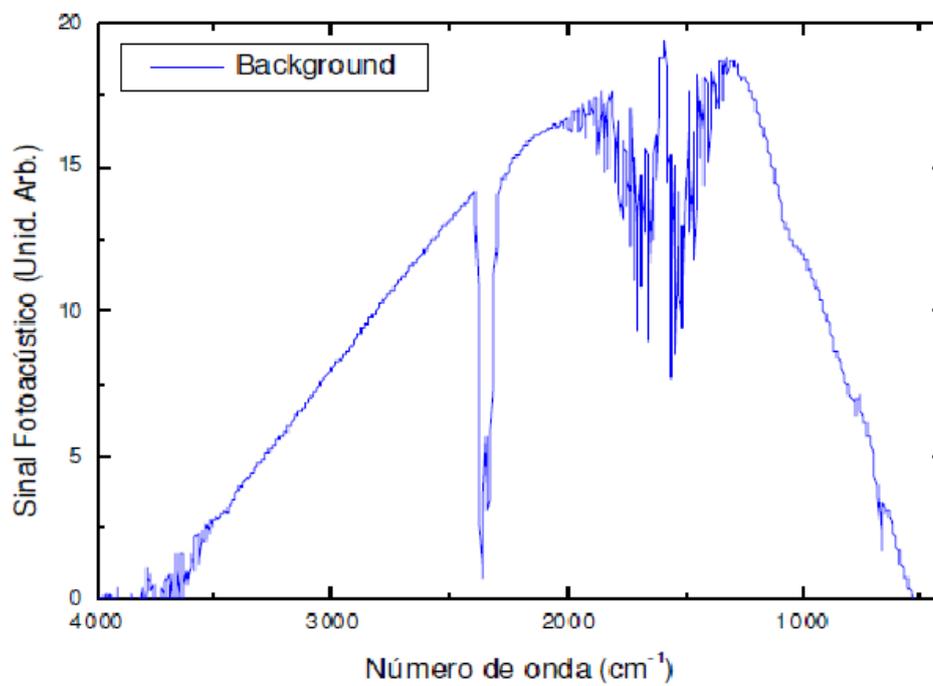
**Figura 3.** Ilustrações das vibrações de dobra do tipo tesoura, balanço, agitação e torção.



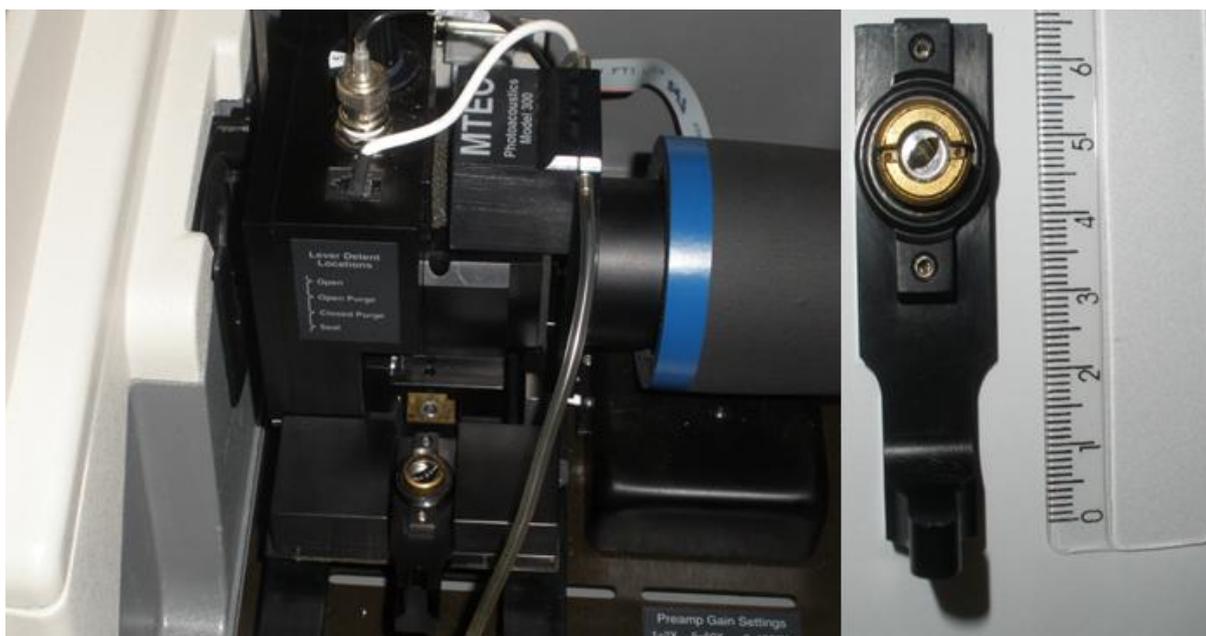
**Figura 4.** Gásteres de indivíduos de *M. consimilis* preparados para análises de HC por FTIR-PAS.



**Figura 5.** Estufa à vácuo utilizada para retirar a umidade dos gásteres antes das análises de HC por FTIR-PAS.



**Figura 6.** Espectro de um Background típico.



**Figura 7.** Célula fotoacústica e em detalhe o suporte característico do espectrofotômetro, onde é colocado o gás para medidas de HC por FTIR-PAS.

## Referências Bibliográficas

Abdalla FC, Jones GR, Morgan ED, Cruz-Landim C. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lapeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genetics and Molecular Research* 2: 191-199.

Andrade LHC, Freitas PG, Mantovani BG, Figueiredo MS, Lima RA, Lima, SM, Rangel MAS, Mussury RM. 2008. Detection of soybean rust contamination in soy leaves by FTIR photoacoustic spectroscopy. *The European Physical Journal Special Topics* 153: 539-541.

Antonialli-Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suarez YR. 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research* 6: 492-499.

Antonialli-Junior WF, Andrade LHC, Suarez YR, Lima SM. 2008. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research* 7: 1-9.

Arnold G, Quenet B, Masson C. 2000. Influence of social environment on genetically based subfamily signature in the honeybee. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2321-2333.

Barbosa LC, Almeida. 2007. *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. Viçosa: UFV.

Blomquist GJ, Tillman JA, Mpuru S, Seybold SJ. 1998. The cuticle and cuticular hydrocarbons of insects: structure, function, and biochemistry. In: *Pheromone communication in social insect*. Westview Press, Boulder, 35-54.

Caires RL, Teixeira AMRO, Suárez RY; Andrade LHC; Lima SM. 2008. Discrimination of Transgenic and Conventional Soybean Seeds by Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 62: 1044-1047.

Cotoneschi C, Dani FR, Cervo R, Scala C, Strassmann JE, Queller DC, Turillazzi S. 2009. *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) Larvae Show Different Cuticular Patterns According to their Sex: Workers Seem Not Use This Chemical Information. *Chemical Senses* 34: 195-202.

Dietermann V, Peeters C, Liebig J, Thivet V, et al. 1992. Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 10341-10346.

Ferreira-Caliman MJ, Cabral, GC, P Mateus S, Turatti, ICC, Nascimento FS, Zucchi R. 2007. Composição química da epicutícula de 77 operárias de *Melipona marginata* (Hymenoptera, apinae, meliponini). Sociedade Brasileira de Ecologia do Brasil-SEB. VIII CEB.

Greene RV, Gordon SH, Jackson MA, Bennett GA. 1992. Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1144-1149.

Gordon SH, Shudy RB, Wheeler DTW, Greene RV. 1997. Identification of Fourier transform infrared photoacoustic spectral features for detection of *Aspergillus flavus* infection in corn. *International of Food Microbiology* 35: 179-186.

Howard RW (1993). Cuticular hydrocarbon and chemical communication. In: *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology* (Stanley-Samuelson DW and Nelson DR, eds.). University of Nebraska Press, Lincoln, 179-226.

Irudayaraj J, Yang H, Sakhamury S. 2002. Differentiation And Detection of Microorganisms Using Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy. *Journal of molecular structure* 606: 181-188.

Jurenka, R. 2005. Book Review: Morgan ED. 2004. Biosynthesis in Insects. RSC Publishing, 199 p. *Ecoscience* 12: 584.

Leal WS. 2005. Pheromone reception. In: Balzani V, Houk KN, Kessler H, Lehn JM, Ley SV, Meijere A, Schreiber SL, Thiem J, Trost BM, Vogel P, Vögtle F, Yamamoto H, editors. *Topics in Current Chemistry*, 1: 1-36. Berlin: Heidelberg.

Lenoir A, Fresneau D, Errard C, Hefetz A. 1999. The individuality and the colonial identity in ants; the emergence of the social representation concept. In: Detrain O, Deneubourg JL, Pasteels J, editors. *Information processing in social insects*. 219-237. Basel Birkhauser.

Liebig J. 2010. Hydrocarbon profiles indicate fertility and dominance status in ant, bee, and wasp colonies. In: Blomquist GJ, Bagnères AG, editors. *Insect hydrocarbons* 254-281. Cambridge University Press.

Locher GA, Giannotti E, Viviane CT. 2009. Brood care behavior in *Ectatomma brunneum* (Hymenoptera: Formicidae, Ectatomminae) under laboratory conditions. *Sociobiology*. 54: 573-587.

Lockey KH. 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 89: 595 – 645.

Lorenzi MC, Bagnères AG, Clément JL, Turillazzi S. 1997. *Polistes biglumis* bimaculatus epicuticular hydrocarbons and nestmate recognition (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux* 44: 123-138.

Lorenzi MC, Cervo R, Zacchi F, Turillazzi S, Bagnères AG. 2004. Dynamics of chemical mimicry in the social parasite wasp *Polistes semenowi* (Hymenoptera: Vespidae). *Parasitology* 129: 643-651.

Manly, Bryan J. F. 2008. *Métodos estatísticos multivariados: uma introdução*, 3ª edition. Porto Alegre: Bookman.

Panek LM, Gamboa GJ, Espelie KE. 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.

Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD. 2005. *Zoologia dos Invertebrados uma Abordagem Funcional-Evolutiva*. Editora ROCA Ltda, São Paulo – SP, 7ª Edição.

Silverstein RM, Webster FX. 2000. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.

Singer TL, Espelie KE and Gamboa GJ. 1998. Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML, Espelie EK, editors. *Pheromone communication in social insects* 104-125. Boulder, Westview Press.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 2002. *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição. Porto Alegre: Editora Bookman.

Smith BC. 1999. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

## CAPÍTULO I

### **Estudo da variação do perfil de hidrocarbono cuticular e aquisição da assinatura química colonial de adultos da vespa *Mischocyttarus consimilis* Zikán, 1949 (Hymenoptera: Vespidae)**

<sup>1</sup>Erika Fernandes Neves, <sup>2</sup>Luis Humberto da Cunha de Andrade, <sup>2</sup>Yzel Rondon Suárez, & <sup>1,2</sup>William Fernando Antonialli-Junior

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Ecologia, Centro Integrado de Análise e Monitoramento Ambiental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados-MS, Brasil.

e-mail:erika\_snakes@yahoo.com.br; luishca@uems.br; yzel@uems.br;williamantonialli@yahoo.com.br;

#### **Resumo**

Uma das condições que favoreceram a evolução e manutenção da socialidade nos insetos é a habilidade de reconhecimento dos companheiros de ninhos de outros indivíduos. O reconhecimento entre os insetos sociais é mediado por sinais químicos que são adquiridos logo após a emergência do adulto e variam de acordo com as tarefas desempenhadas pelos indivíduos nas colônias. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o momento em que adultos da vespa *M. consimilis* adquirem a assinatura química de suas colônias e a variação dos perfis de hidrocarbono cuticular entre rainhas, operárias e machos. O método utilizado, não usual, foi espectroscopia óptica por transformada de Fourier no infravermelho médio por detecção fotoacústica (FTIR-PAS) diretamente no gáster de cada indivíduo. Foi possível concluir por meio das análises que indivíduos jovens levam de 3 a 4 dias para adquirirem a assinatura química da colônia e que este perfil varia entre as castas e o sexo, sendo que o perfil de operárias foi mais próximo aos de rainhas, o que provavelmente relaciona-se a maior similaridade de tarefas executadas por esses indivíduos na colônia.

**Palavra-chave:** Feromônios de superfície, Divisão de trabalho, Repertório comportamental, Identidade colonial.

## **Abstract**

One of the conditions that had favored the evolution and maintenance of the socialidade in the insects is the ability of recognition nestmate other individuals. The recognition between the social insects is mediated by chemical signals that are soon acquired after the emergency of the adult and vary in accordance with the tasks played for the individuals in the colonies. In this context, this work had as objective to evaluate the moment where adult of wasp *M. consimilis* they acquire the chemical signature of its colonies and the variation of the profiles hydrocarbons to cuticular between queens, laborers and males. The used method, not usual, was optic Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy detention (FTIR-PAS) directly in gáster of each individual. It was possible to conclude by means of the analyses that young individuals lead of 3 the 4 days to acquire the chemical signature of the colony and that this profile varies between chaste and the sex, being that the profile of laborers was next to the ones to queens, which probably it becomes related bigger similarity of tasks executed for these individuals in the colony.

**Keywords:** Surface pheromones, Division of work, Mannering repertoire, Colonial identity.

## Introdução

Na sociedade dos insetos a divisão reprodutiva de trabalho representa um importante papel na manutenção da estrutura da colônia: operárias cooperam com suas rainhas, que são geralmente morfológicamente distintas tendo como papel a reprodução e usam um elaborado sistema de comunicação para coordenar o comportamento das operárias (Wilson 1971). Uma das condições que favoreceram a evolução e manutenção deste sistema é a habilidade de reconhecimento dos companheiros de ninhos de outros indivíduos (Hamilton 1987).

A alocação de tarefas nos insetos é um sistema que tem sido bastante estudado, por exemplo em formigas cortadeiras (*Pogonomyrmex barbatus*) e é regulado por padrões de interação entre as operárias que executam diferentes tarefas, sendo identificadas através de pistas presentes na cutícula e detectados através de contatos antenais, como uma mistura de hidrocarbonos estimulando o forrageio (Greene e Gordon 2003, 2007). Nos Trabalhos realizados com a formiga *Solenopsis invicta* por Vinson et al. (1980), Thompson et al. (1981) e Vander Meer et al. (1982) e Antonialli-Junior et al. (2007) com *Ectatomma vizottoi* foi demonstrado a presença de hidrocarbonos diferenciados nas cutículas, de acordo com cada casta específica destas espécies.

Esses trabalhos demonstram que o reconhecimento das funções exercidas individualmente e pelos indivíduos em colônias de insetos sociais é mediado por sinais químicos, que eventualmente são adquiridos logo após sua emergência (Gamboa et al. 1996). Gamboa et al. (1986) constatou que adultos de colônias da vespa *Mischocyttarus mexicanus* acumulam odor com a idade a partir de sua emergência. Por outro lado, a aceitação de indivíduos de outras colônias diminui à medida que envelhecem.

Experimentos com insetos sociais demonstram que indivíduos recém-emergidos podem ser transferidos de uma colônia para outra (Litte 1976, vespas; Morel et al. 1988, formigas; Breed et al. 1988, abelhas), ou até mesmo entre espécies como descrito por Stuart (1992),

sugerindo que os indivíduos recém-emergidos ainda não possuem o odor da sua colônia, não sendo rejeitados por outras (Jaisson 1985).

Outro fator que tem se mostrado importante para sinais de reconhecimento é o odor do próprio material do ninho, bem documentado por Espelie et al. (1990) que relata existir compostos ricos em hidrocarbono capazes de serem transferidos entre indivíduos e utilizados como uma forma de assinatura para reconhecimento da colônia. Assim, em vespas sociais, processos de reconhecimento são mediados pelo cheiro da superfície do ninho, que por sua vez é coberta por hidrocarbonos cuticulares (HC) produzidos por membros da colônia. O cheiro do ninho é usado como referência por vespas quando elas aprendem o odor da de sua colônia e formam um modelo de reconhecimento de emergência (Gamboa et al. 1996).

Neste contexto este trabalho teve como objetivos avaliar o momento em que adultos da vespa *M. consimilis* adquirem a assinatura química de suas colônias e a variação dos perfis de HC entre rainhas, operárias e machos.

## **Materiais e métodos**

Para execução dos experimentos na avaliação de quando a assinatura química da colônia é adquirida pelos adultos, foram utilizadas 10 colônias de *M. consimilis* localizadas no Campus da UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul (22°13'16 "S, 54°48'20" W). Para o monitoramento das idades, todos os indivíduos recém-emergidos das colônias foram marcados com tinta atóxica no tórax (Fig. 1). Foram analisados 10 indivíduos de cada idade, coletados de diferentes colônias, desde recém-emergidos até 5 dias de vida baseado nos resultados de transferência comportamentais encontrados por Panek et al. (2001).

Para avaliar a variação dos HC de operárias, rainhas e machos foram utilizadas 6 colônias, e a diferenciação entre machos e fêmeas foi realizada através das antenas, uma vez que os machos possuem uma antenômero a mais, apresentando dessa forma uma curvatura na antena

(Fig. 2) . Foram utilizadas duas colônias de uma região rural da Bodoquena (-20<sup>o</sup>32'19''S, -56<sup>o</sup>42'54''), duas do campus da UFGD- Dourados (-22<sup>o</sup>13'16''S, -54<sup>o</sup>48'20''W), e duas da área urbana do município de Batayporã (-22<sup>o</sup>17'96''S, -53<sup>o</sup>77'02''W). No Total foram utilizados 10 rainhas 30 operárias e 12 machos.

Todos os insetos utilizados para ambas as análises, após coleta, eram sacrificados e conservados por congelamento, evitando-se assim o uso de qualquer tipo de fixador ou conservante químico que poderia reagir com os elementos químicos da cutícula.

Para análise do perfil de HC, foram extraídos os gásteres de cada indivíduo. O gáster foi utilizado por ser a região de maior concentração dos HC (Cuviller-Hot et al. 2001).

A técnica aplicada foi Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS segundo Antonialli-Junior et al. (2007 e 2008) até agora, não usual para este tipo de trabalho, que, no entanto, têm se mostrado confiável, como descrito pelos trabalhos de Antonialli-Junior et al. (2007 e 2008).

A técnica (FTIR-PAS) é uma medida da radiação absorvida pela amostra, suas vantagens são muito interessantes para sua aplicação em materiais de grande fragilidade, como materiais biológicos, devido à intensidade da radiação ser baixa não provoca a destruição da amostra, além de, poder ser empregada para medida de amostras com dimensões reduzidas (Greene et al. 1992).

A FTIR-PAS é realizada na região espectral do infravermelho médio que compreende a faixa espectral de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> (Skoog et al. 2002; Silverstein et al. 2000) . 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, sendo este, o aspecto mais vantajoso dessa técnica (Smith 1999).

Para minimizar a umidade que pode interferir na leitura do espectro, as amostras foram colocadas em estufa a vácuo por 48 horas. Em seguida, os gásteres foram colocados no suporte característico da célula fotoacústica, e purgado com gás Hélio. Foi obtido o espectro resultante

para cada abdômen pela média de 64 espectros com resolução de  $8\text{ cm}^{-1}$ . Posteriormente, foram separadas as linhas de absorção entre  $400$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$ , aquelas relacionadas às vibrações de hidrocarbonos, que podem trazer as informações que se pretende analisar.

Todos os dados foram avaliados por meio de análise discriminante *stepwise*, a qual pode revelar o conjunto de variáveis que melhor explicam os grupos avaliados caso exija diferença, sendo indicada pela Wilk's Lambda, medida de diferença caso exista, entre os grupos (Quinn e Keough 2002).

## **Resultados e discussão**

Os resultados da análise discriminante demonstram que os indivíduos das colônias de *M. consimilis* começam a adquirir a assinatura química de sua colônia entre o terceiro e quarto dias após sua emergência, havendo, ainda uma modificação do perfil de HC no quinto dia (Fig.1) corroborando os dados descritos por Panek et al. (2001), os quais constataram através de transferências comportamentais entre indivíduos de diferentes colônias que os membros das colônias de *Polistes fuscatus* adquirem sua assinatura química entre 48 e 72 horas após a emergência do adulto.

Os resultados mostram que a primeira raiz canônica explicou 73% dos resultados e a segunda 27% somadas as duas explicaram 100% dos resultados. A análise discriminante mostrou-se significativa com Wilks's Lambda = 0,005;  $F=8.988$ ;  $P<0.001$ , na qual dos 18 picos analisados, 7 foram significativos para separação dos grupos (1030, 1157, 1450, 1524, 1651, 2634, 2877).

Os espectros referentes aos gásteres analisados através da técnica FTIR-PAS mostram que os grupos funcionais significativos entre  $4000$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ , foram identificados como estando ligados principalmente à quitina e hidrocarbonos presentes em sua cutícula (Tabela 1.).

A vibração do N-H de dobra com o comprimento de onda por volta de  $1524\text{ cm}^{-1}$  é um importante grupo, sua intensidade foi quase tão intensa quanto o de  $1651\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao C=O com o modo vibracional de estiramento (Antoniali-Junior et al. 2007). Portanto, segundo Antoniali-Junior et al. (2007) a combinação dessas linhas podem ser usadas para diagnosticar a quitina ou amidos secundários nas análises cuticulares, juntamente com a linha de absorção de  $2634\text{ cm}^{-1}$  com vibração de dobra de sobreposição. Os demais comprimentos de onda ( $2877$ ,  $1450$ ,  $1157$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$ ) são referentes aos hidrocarbonos (C-H) encontrados na cutícula, variando entre o modo vibracional de estiramento simétrico ( $2877\text{ cm}^{-1}$ ) e estiramento assimétrico de tesoura ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ), e o de dobra com C-H (benzeno) no plano ( $1157$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$ ).

Esses resultados corroboram às análises de Panek et al. (2001), cujo autores transferiram indivíduos recém-emergidos de diferentes idades entre diferentes colônias de *P. fuscatus* e observaram que as fêmeas mais velhas aceitavam essas vespas até 72 horas. Após esse período os indivíduos eram expulsos das colônias agressivamente, demonstrando que, de fato, com o passar dos dias, os indivíduos mais jovens adquirem uma assinatura química específica de sua colônia.

As análises do perfil de HC de rainhas, operárias e machos demonstram que estes três grupos apresentam variação significativa (Figura 2.). De fato, a primeira raiz canônica explicou 77% dos resultados e a segunda 23%, somando-se as duas explicaram 100% da separação dos grupos. Os picos que foram mais significativos foram de números de onda 667, 895, 953, 1030, 1076, e 1115. (Wilks's Lambda = 0,034; F=12.364; P<0.001). Os números de onda 667, 895 e  $953\text{ cm}^{-1}$  (Tabela 2 e Figura 3) correspondem ao grupo funcional C-H de dobra fora do plano (benzeno) como mostrado na Tabela 2. Já os  $1030$ ,  $1076$  e  $1115\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao C-H com dobra no plano (benzeno).

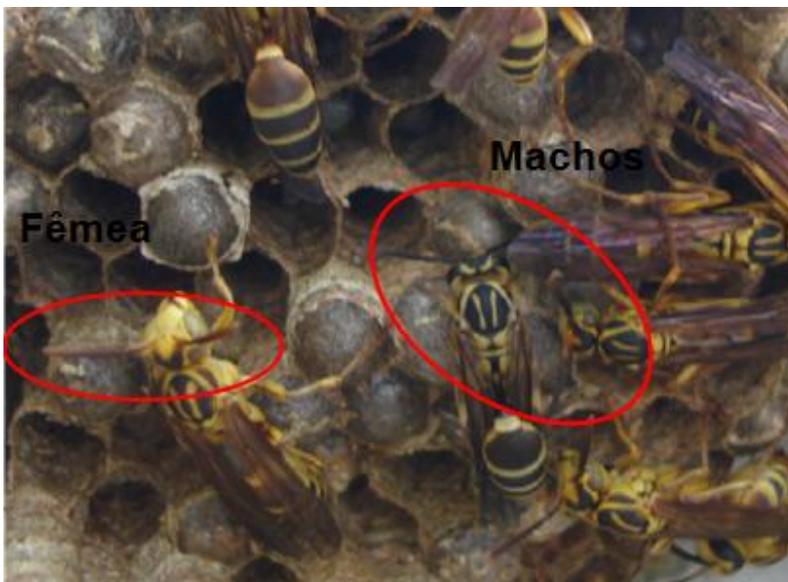
Como já descrito por Shorey (1973) os HC estão incluídos na classe conhecida como "feromônios de superfície", sendo importantes para os insetos sociais pois permitem o reconhecimento de indivíduos da mesma espécie, os companheiros de ninho, e indivíduos aparentados, ou até mesmo membros de diferentes castas.

De acordo com nossos resultados, o perfil de HC das operárias está mais próximo ao de rainhas do que dos machos. Provavelmente, isto está relacionado ao sexo e também ao repertório de tarefas realizadas nas colônias, tanto por rainhas quanto por operárias que tendem a ser mais próximas entre si, quando comparados aos machos, uma vez que estes não precisam de uma concentração alta de hidrocarbonos por não haver necessidade de ter seu perfil químico bem definido, dado o repertório de comportamentos executados por estes indivíduos na colônia (Antoniali-Junior et al. 2007). Além disto, no trabalho de Lengyel et al. (2007) foi possível constatar que operárias de *Myrmicaria eumenooides* têm seu repertório de execução de tarefas modificadas na colônia de acordo com as mudanças gradativas em seu perfil de HC, uma vez que segundo Wagner et al. (1998) o perfil de HC está relacionado ao status reprodutivo e individual de cada indivíduo dentro de uma colônia.

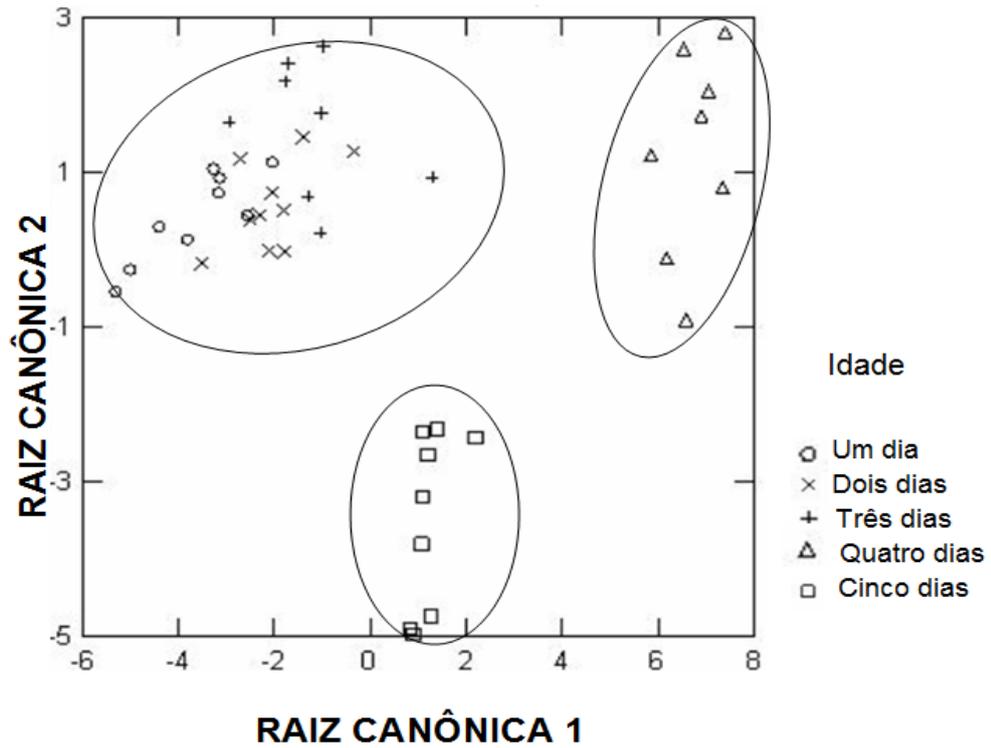
Pôde-se inferir, portanto, que os indivíduos mais jovens de *M. consimilis* levam de 3 a 5 dias para adquirem a assinatura química da colônia representada pelo seu perfil de HC ou feromônios de superfície e que este perfil varia entre as castas e sexo, estando relacionado, como já descrito em trabalhos anteriores, as funções desempenhadas por cada indivíduo na colônia.



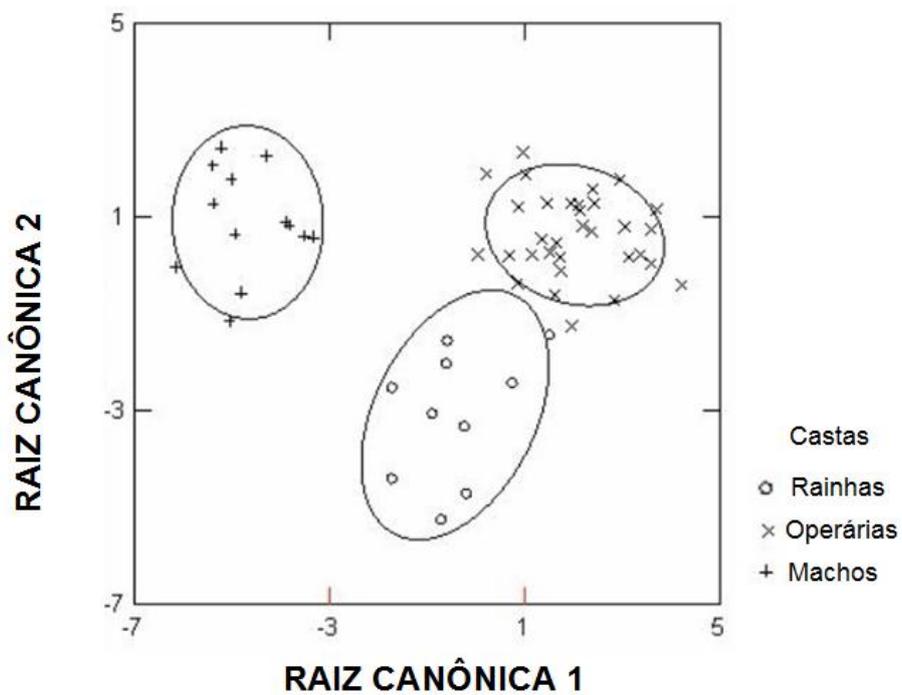
**Figura 1.** Fêmea de *M. Consimilis* recém- emergida marcada para monitoramento da idade.



**Figura 2.** Fêmea e Machos de *M. consimilis*. Em detalhe as antenas, as quais em machos são maiores por possuírem um antenômero a mais.



**Figura 3.** Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação do HC em diferentes idades da vespa *M. consimilis*.



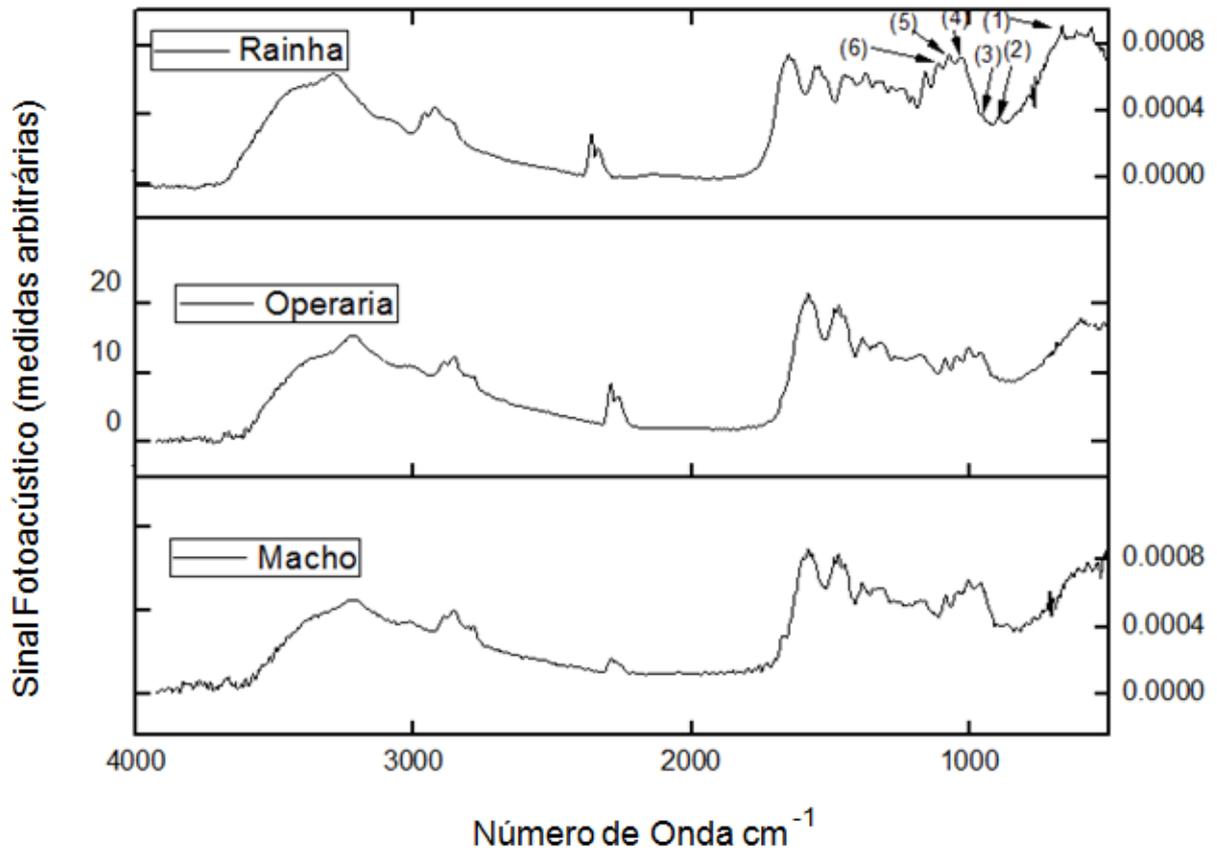
**Figura 2.** Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação de casta e sexo da vespa *M. consimilis*.

**Tabela 1.** Número de onda, coeficientes das duas raízes canônicas, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho dos gásteres das vespas para análise das idades.

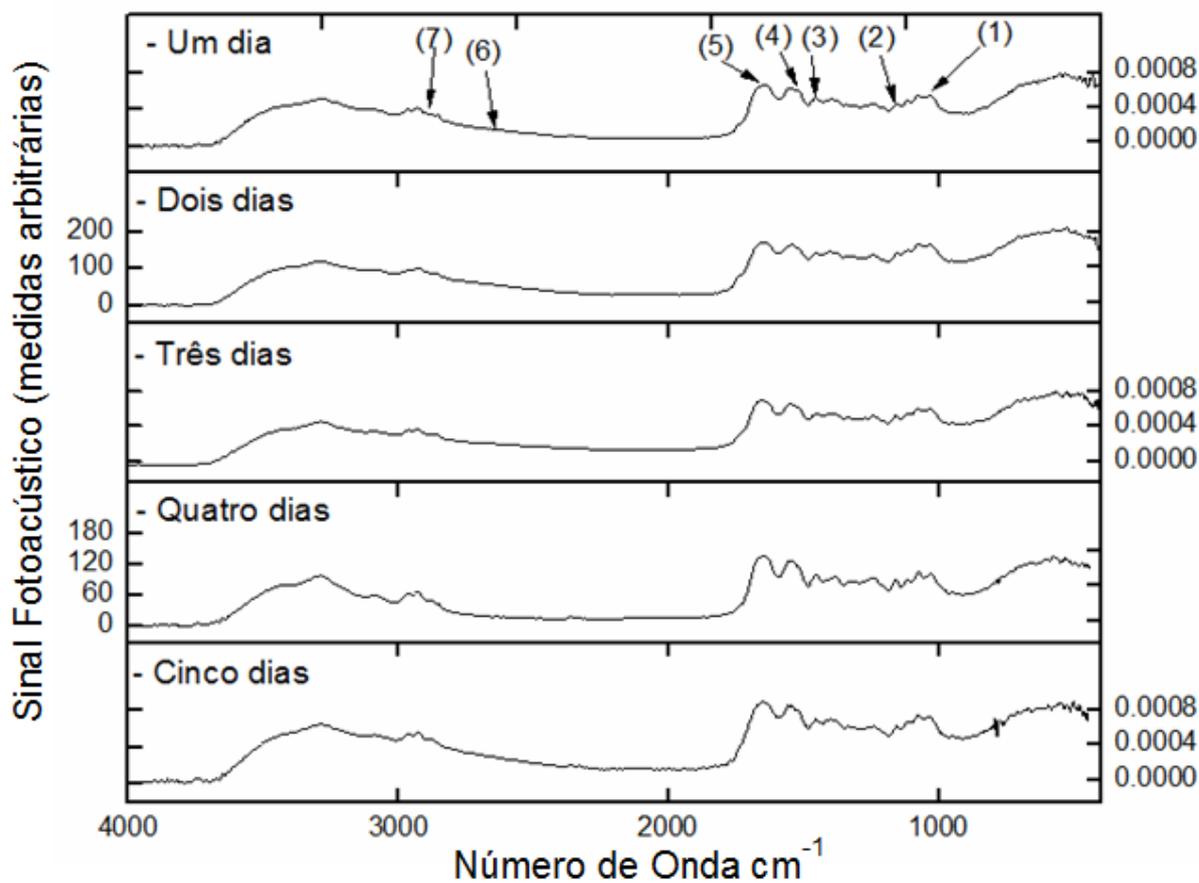
Picos	N <sup>o</sup> de onda (cm <sup>-1</sup> )	Raiz canônica1	Raiz canônica2	Grupo Funcional	Modo Vibracional
(1)	1030	1,746	0,121	No plano C-H (Benzeno)	Dobra
(2)	1157	-2,722	-0,224	No plano C-H (Benzeno)	Dobra
(3)	1450	2,141	-0,419	C-CH <sub>2</sub> C-CH <sub>3</sub>	Dobra assimétrica em tesoura
(4)	1524	-2,112	-0,943	-N-H	Dobra
(5)	1651	4,001	-1,825	-C=O	Estiramento
(6)	2634	-1,442	-0,015	-C-N e N-H	Dobra de sobreposição
(7)	2877	1,573	-0,178	-CH(CH <sub>3</sub> )	Estiramento simétrico

**Tabela 2.** Número de onda, coeficientes das duas raízes canônicas, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho dos gásteres das vespas g análise de casta e sexo

Picos	N <sup>o</sup> de onda (cm <sup>-1</sup> )	Raiz canônica1	Raiz canônica2	Grupo Funcional	Modo Vibracional
(1)	667	2, 444	0, 242	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
(2)	895	1, 009	0, 200	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
(3)	953	- 0, 025	- 1, 210	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
(4)	1030	- 2, 432	-0, 629	No plano C-H (benzeno)	Dobra
(5)	1076	2, 896	-0, 291	No plano C-H (benzeno)	Dobra
(6)	1115	-0, 146	2, 762	No plano C-H (benzeno)	Dobra



**Figura 3.** Curva média para cada grupo de espectros de absorção no infravermelho médio dos gásteres de operárias, rainhas e machos de *M.consimilis* com indicação dos picos significativos para separação dos grupos observados.



**Figura 4.** Curva média para cada grupo de espectros de absorção no infravermelho médio dos gásteres de diferentes idades de *M. consimilis* com indicação dos picos significativos para separação dos grupos observados.

### Agradecimentos

Agradecemos à Fundect pelo Apoio financeiro, a UEMS pelo suporte técnico e ao CNPq pela bolsa de produtividade de William Fernando Antonialli Junior e Luis Humberto da Cunha Andrade.

## Referências Bibliográficas

Antonialli-Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suarez YR. 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research* 6: 492-499.

Antonialli-Junior WF, Andrade LHC, Suarez YR, Lima SM. 2008. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research* 7: 1-9.

Breed MD, Stiller TM, Moor MJ. 1988. The ontogeny of kin discrimination cues in the honeybee, *Apis mellifera*. *Behaviour Genetics* 18: 439-448.

Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, Peeters C. 2001. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *Journal of Insect Physiology* 47: 485-493.

Espelie KE, Butz VM, Dietz A. 1990. Dextydecanoate: A major component of the tergite glands of honeybee queens (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research* 29: 15-19.

Gamboa GJ, Reeve HK, Ferguson ID, Wacker TL. 1986. Nestmate recognition in social wasps: the origin and acquisition of recognition odours. *Animal Behaviour* 34: 685-695.

Gamboa GJ, Grudzier TA, Espelie KA, Bura EA. 1996. Kin recognition in social wasps: combining behavioral and chemical evidence. *Animal Behaviour* 51: 625-629.

Greene RV, Gordon SH, Jackson MA, Bennett GA. 1992. Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1144-1149.

Greene MJ, Gordon DM. 2003. Social insects: Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature* 423, 32.

Greene MJ, Gordon DM. 2007. Interaction rate informs harvester ant task decisions. *Behavior ecology* 18: 451-455.

Hamilton WD. 1987. Discrimination nepotism: expectable, common, overlooked. In: Fletcher DJC, Michener CD. *Kin Recognition in Animals* New York: Wiley 417-437.

Jaisson P. 1985. Social behavior. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 9: 673-694. Pergamon Press.

Lengyel F, Westerlund SA, Kaib M. 2007. Juvenile hormone III influences task-specific cuticular hydrocarbon profile changes in the ant *Myrmicaria eumenoides*. *Journal of Chemical Ecology* 33: 167-181.

Litte MI. 1976. Self, kin, and social behavior in the polistine wasp *Mischocyttarus mexicanus*. PhD Thesis, Cornell Univ. Ithaca, NY.

Morel L, Vander Meer RK, Lavine BK. 1988. Ontogeny of 40 nestmate recognition cues in the red carpenter ant (*Camponotus oridanus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 22: 175-183.

Panek LM, Gamboa GJ, Espelie KE. 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.

Quinn GP, Keough MJ. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge.

Silverstein RM, Webster FX. 2000. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.

Shorey HH. 1973. Behavioral responses to insect pheromones. *Annual Review Entomology* 18: 349-380.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 2002. *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição. Porto Alegre: Editora Bookman.

Smith BC. 1999. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Stuart RJ. 1992. Nestmate recognition and the ontogeny of acceptability in the ant *Leptothorax curvispinosus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 30: 403-408.

Thompson MJ, Glancey BM, Robbins WE, Lofgren CS, Dutky SR, Kochansky J, Vander Meer, RK, Glover A R. 1981. Major hydrocarbons of the postpharyngeal glands of mated queens of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*. *Lipids* 16: 485-495.

Vander Meer RK, Glancey BM, Lofgren CS. 1982. Biochemical changes in the crop, oesophagus and postpharyngeal gland of colony-founding red imported fire ant queens (*Solenopsis invicta*). *Insect Biochemistry* 12: 123-127.

Vinson SB, Phillips JSA, William HJ. 1980. The function of the postpharyngeal glands of the red imported fire ant. *Solenopsis invicta* Buren. *Journal of Insect Physiology* 26: 645-650.

Wagner D, Brown MJF, Broun P, Cuevas W, Moses LE, Chao DL, Gordon DM. 1998. Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *Journal of Chemical Ecology* 24: 2021-2037.

Wilson EO. 1971. *The Insect Societies*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.

## CAPÍTULO II

### **Diferenciação intra-específica pelo perfil de hidrocarbono cuticular na vespa *Mischocyttarus consimilis* Zikán, 1949 (Hymenoptera: Vespidae) por FTIR-PAS**

<sup>1</sup>Erika Fernandes Neves, <sup>2</sup>Luis Humberto da Cunha de Andrade, <sup>2</sup>Yzel Rondon Suárez, & <sup>1,2</sup>William Fernando Antonialli-Junior

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Ecologia, Centro Integrado de Análise e Monitoramento Ambiental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados-MS, Brasil.

e-mail:erika\_snakes@yahoo.com.br; luishca@uems.br; yzel@uems.br;williamantonialli@yahoo.com.br;

#### **Resumo**

Os hidrocarbonos presentes na cutícula dos insetos sociais atuam em funções comunicativas tais como o reconhecimento de companheiros de ninho, companheiros sexuais, e de casta, variando de acordo com os mais diversos fatores principalmente os ambientais, uma vez que a base da organização desses insetos está na capacidade individual de reconhecimento dos membros de seu grupo. Visto que são raros os trabalhos que investigaram diferenças entre populações geográficas em espécies de insetos sociais, sobretudo, vespas, este trabalho teve como objetivo avaliar as diferenças intra-específicas na vespa *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera: Vespidae) pela análise dos perfis de hidrocarbono cuticular. Foi possível detectar que os perfis de hidrocarbonos cuticulares de populações que vivem em ambientes similares se assemelham, reforçando o entendimento de que em insetos sociais o reconhecimento de indivíduos se dá através dos hidrocarbonos cuticulares que podem ser geneticamente determinados ou adquiridos através do ambiente, como odor da colônia e ou influência da dieta.

**Palavra-chave:** variação populacional, marcadores bioquímicos, assinatura química.

## **Abstract**

The hydrocarbons present in the cuticle of the social insects act in communicative functions such as the recognition of friends of nest, sexual friends, and of chaste, varying in accordance with the most diverse factors mainly the ambient ones, a time that the base of the organization of these insects is in the individual capacity of recognition of the members of its group. Since the works are rare that had investigated differences between geographic populations in species of social insects, over all, wasps, this work had as objective to evaluate the intra-specific differences in the wasp *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera: Vespidae) for the analysis of the profiles of hydrocarbon cuticular. Analyzing the results it was possible to perceive that the profiles of hydrocarbons cuticles of populations that live in similar environments if group, strengthening the agreement of that in social insects the recognition of individuals if of the one through the hydrocarbons cuticles that they can genetically be determined or be acquired through the environment, as odor of the colony and or influence of the diet.

**Keywords:** Population variation, Markers biochemists, Chemical signature.

## Introdução

Os hidrocarbonos cuticulares (HC) atuam em funções comunicativas nos insetos sociais tais como o reconhecimento de companheiros de ninho, companheiros sexuais, e de casta (Howard 1993; Clément e Bagnères de 1998; Singer et al. 1998; Vander Meer e Morel 1998). Estes elementos presentes na cutícula do inseto, variam de acordo com os mais diversos fatores, sobretudo os ambientais (Dahbi et al. 1996).

A variação geográfica é exibida em quase todas as características nos seres vivos, incluindo aquelas mais intimamente associadas com o papel ecológico das espécies (Futuyma 1992). Contudo a variação intra-específica existe tanto no mesmo local quanto entre locais diferentes. Se coletarmos um certo número de indivíduos de determinada espécie em dado local, eles podem diferir –variação intra-populacional– freqüentemente apresentando uma distribuição normal. Da mesma forma, se coletarmos indivíduos de uma mesma espécie em diferentes locais, eles também podem diferir- variação entre populações ou variação geográfica (Ridley 2006).

Uma das ferramentas utilizadas, recentemente para avaliar variações entre populações de insetos é a utilização da composição de HC como um marcador bioquímico (Calderón-Fernández et al. 2005). Por exemplo, através de dados de hidrocarbonos e morfometria foi constatado que o Hemiptera *Triatoma dimidiata* inclui várias populações submetidas a divergentes caminhos evolutivos, com o isolamento geográfico como uma possível causa (Marcilla et al. 2001).

Neste contexto, as variações no perfil químico da cutícula foram encontrados em vários insetos sociais, relacionadas não só à colônia, mas também a seu ciclo sazonal, tarefa colonial, estado reprodutivo e origem geográfica (Daportto et al. 2004). Por exemplo, a influência da localização geográfica sobre a composição química dos perfis de HC da formiga *Cataglyphis iberica* foi documentada por Dahbi et al. (1996), enquanto Brown et al. (1996) utilizaram estes mesmos elementos para distinguir diferentes populações do térmita *Drepanotermes perniger*.

Com base na variação interpopulacional nos perfis de HC de *Drosophila mojavensis*, Etges e Jackson (2001) sugeriram que a diferenciação pode ocorrer de acordo com a localização geográfica, o mesmo sendo constatado no trabalho de Calderón--Fernández et. al (2005), no qual o padrão de HC provou ser útil para estudar a variabilidade intraespecífica em populações de *T. dimidiata* da Guatemala.

Um dos poucos trabalhos realizados com vespas, analisando diferenças populacionais usando estes elementos foi o de Dapporto et al. (2004) com *Polistes dominulus* o qual foi possível perceber a relação direta do ambiente com as variações químicas.

Visto que são raros os trabalhos que investigaram diferenças intraespecíficas em espécies de vespas, este trabalho teve como objetivo avaliar as diferenças entre populações geográficas da vespa *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera: Vespidae) pela análise dos perfis de HC.

## **Materiais e métodos**

Foram coletadas 12 colônias de *M. consimilis* de diferentes regiões de Mato Grosso do Sul (Bodoquena, Batayporã, Dourados, Maracaju, Eldorado e Sidrolândia). Foram utilizadas de 15 a 25 indivíduos por colônia, dependendo do tamanho das colônias.

Todas as colônias foram coletadas com auxílio de um saco plástico escuro que era colocado sobre os ninhos que, em seguida eram desprendidos pelos pedúnculos. Todos os indivíduos eram então fixados e conservados por congelamento, evitando, assim, o uso de qualquer tipo de fixador ou conservante químico que poderia reagir com os elementos químicos da cutícula dos insetos.

Para análise do HC foram extraídos os gásteres dos indivíduos, e depositados separadamente em placas de Petri. Posteriormente foram colocados em estufa a vácuo por 48 horas para minimizar a umidade. A técnica aplicada foi a Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS segundo Antonialli-Junior (2007 e 2008).

A técnica (FTIR-PAS) é uma medida da radiação absorvida pela amostra, suas vantagens são muito interessantes para sua aplicação em materiais de grande fragilidade, como materiais

biológicos, devido à intensidade da radiação ser baixa, não provoca a destruição da amostra, além de, poder ser empregada para medida de amostras com dimensões reduzidas (Greene et al. 1992).

A FTIR-PAS 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) . 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, sendo este, o aspecto mais vantajoso dessa técnica (Smith 1999).

A FTIR-PAS foi realizada diretamente no gáster, porque é nesta parte do corpo onde mais se concentram os HC (Cuvillier-Hot et al. 2001).

Para determinação dos espectros de infravermelho médio das vespas das colônias das diferentes populações, os gásteres foram colocados no suporte característico da célula fotoacústica, a qual foi purgada com gás Hélio. O espectro resultante para cada gáster foi obtido pela média de 64 espectros com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ . Posteriormente, foram separadas as linhas de absorção entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , principalmente aquelas relacionadas às vibrações de hidrocarbonos, que podem trazer as informações que se pretende analisar.

A análise de diferenciação das espécies foi realizada utilizando a função discriminante *stepwise*, indicada por selecionar um conjunto de variáveis que melhor diferenciam (caso exista diferença) os grupos analisados (Quinn e Keough 2005). Nesta análise a estatística Wilk's Lambda é utilizada como medida da diferença entre os grupos, 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.

## Resultados e discussão

A análise discriminante para as diferentes populações mostrou-se significativa com Wilks's Lambda = 0,001; F=15,401; P<0.001, na qual 8 dos 18 picos foram importantes para a separação dos grupos (Tabela 1. e Figura 2.). Os resultados da primeira raiz canônica explicaram 57% dos resultados, e da segunda raiz 43% totalizando 100% da explicação dos resultados (Tabela 1.)

Contudo, pelo gráfico de dispersão (Figura 2) é possível observar que os espectros obtidos na análise de FTIR-PAS são bem similares, apresentando diferenças sutis.

Os picos mais importantes para a separação dos grupos foram 667, 895 e 953  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem ao grupo funcional C-H (benzeno) com dobra fora do plano, sendo o primeiro pico (667 $\text{cm}^{-1}$ ) uma banda mais larga em relação às outras duas. Os picos 1030, 1076 e 1157  $\text{cm}^{-1}$  que também correspondem ao grupo funcional C-H (benzeno) com dobra no plano são picos mais expressivos com vibração um pouco mais intensa em relação aos picos citados anteriormente, porém, provavelmente todos correspondentes aos hidrocarbonos presentes na cutícula dessa espécie. O pico 1238  $\text{cm}^{-1}$  com valor também significativo para separação das populações corresponde ao grupo funcional C-N com modo de vibração de estiramento e o pico 1524  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao grupo funcional N-H com vibração em estiramento entrando no grupo das amidas.

Analisando os resultados foi possível perceber que ocorreram agrupamentos de acordo com o tipo de ambiente onde foram coletadas as colônias. Resultados similares foram descritos por Dahbi et al. (1996) estudando populações da formiga *Cataglyphis iberica*. Neste trabalho foram avaliados os comportamentos antagonistas entre as formigas pertencentes a diferentes colônias de uma mesma população e entre as formigas de colônias de diferentes populações que apresentaram perfis químicos distintos.

As colônias coletadas em um córrego (Córrego Janção) localizado em Maracaju separaram-se das demais, provavelmente porque foi a única população na qual as colônias foram coletadas em uma região, na qual predominava um ambiente de mata, sem entorno rural. Pelo mesmo motivo a população de Bataypora distinguiu-se das outras porque estavam em uma área urbana, no centro da cidade (Figura 1).

As populações de Sidrolândia, Eldorado e Dourados encontravam-se em área urbana periférica, próximas às áreas rurais (Figura.1). Também pelo mesmo motivo, provavelmente, estas populações se sobrepuseram a de Bodoquena (Figura 1), pois esta população foi coletada em uma área rural de fazenda.

Esses resultados apontam a influência que o ambiente exerce sobre estas diferentes populações que estão sob diferentes pressões ambientais. De fato, segundo Mayr (1963) cada população difere das demais, e o grau de diferenças entre diferentes populações de uma espécie varia da quase completa identidade até uma diferenciação quase a nível de espécies.

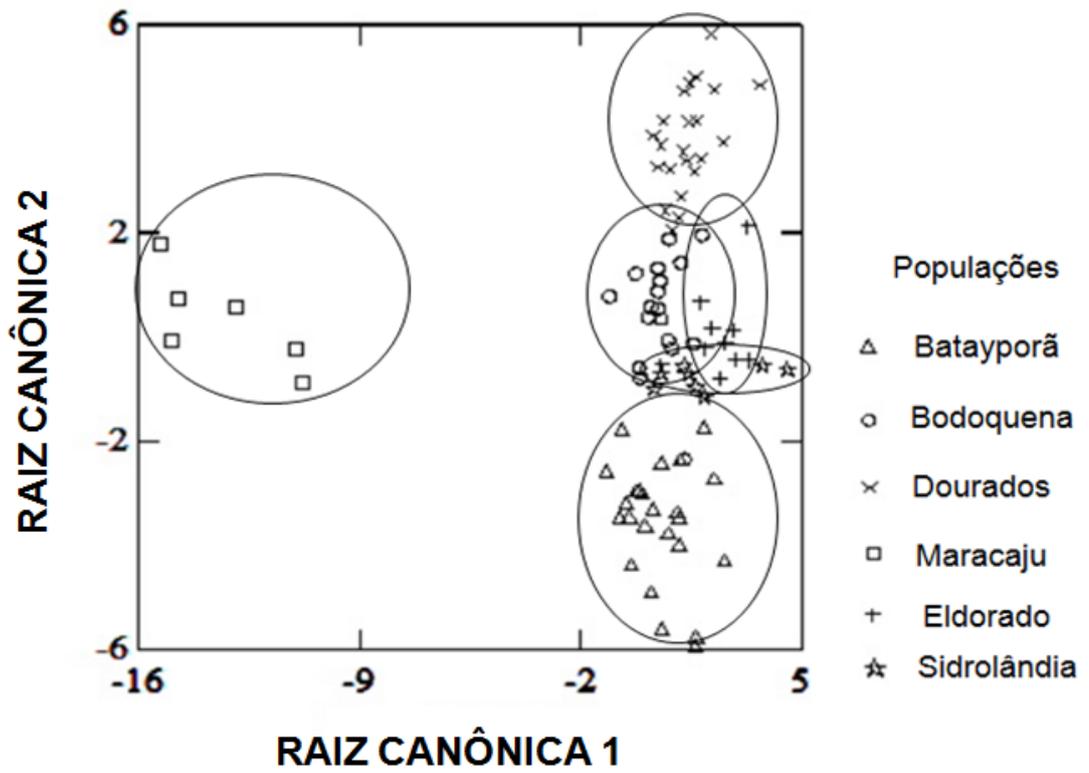
Nos insetos sociais o reconhecimento de indivíduos da mesma colônia se dá através dos hidrocarbonetos cuticulares (Gamboa et al. 1996; Lahav et al. 1999; Wagner et al. 2000; Lenoir et al. 2001) que podem ser geneticamente determinados (Beye et al. 1998; Suarez et al. 2002; Guerrieri e D’Ettorre 2007; Thurin e Aron 2008) ou adquiridos através do ambiente, como odor da colônia (Carlin e Hölldobler 1983) e influência da dieta (Liang e Silverman 2000; Buczkowski e Silverman 2006; Sorvari et al. 2008) ou pela combinação dos dois componentes (Jutsum et al. 1979; Crosland 1989; Pirk et al. 2001; Suarez et al. 2002). Estes sinais são compartilhados pelos indivíduos da colônia através das interações sociais como trofalaxia, “grooming” e contato físico (Soroker et al. 1998; Lahav et al. 1999).

A variação geográfica existe em todas as espécies e pode ser causada por adaptação às condições locais (Ridley 2006). Neste caso, portanto, parece que os fatores ambientais são

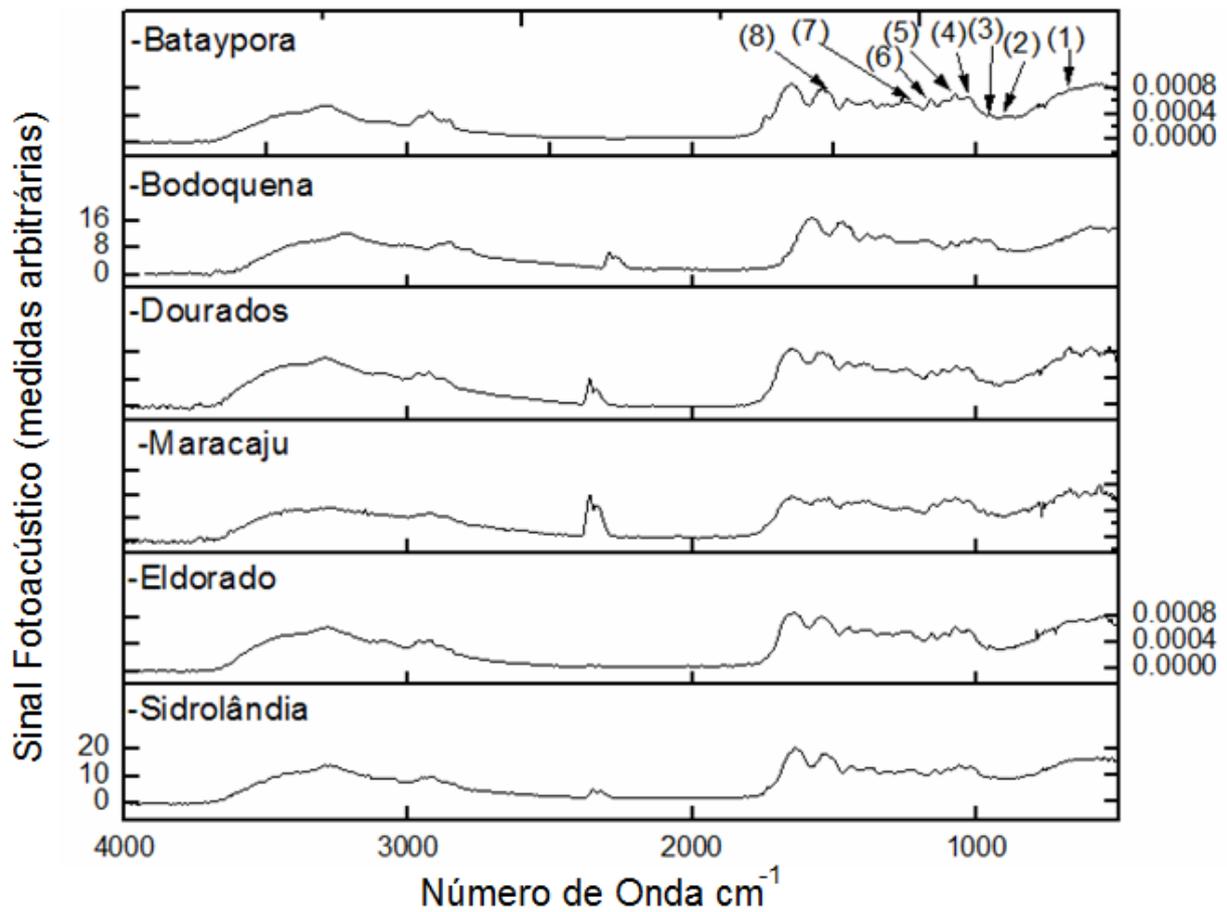
aspectos importantes pra distinção dessas populações. Os fatores ambientais podem afetar diferentes aspectos de populações sobre diferentes pressões ambientais (Berven et al. 1979).

De fato, a variação de perfis de HC, em diferentes populações geográficas já foi descrita no trabalho de Etges e Ahrens (2001), estudando a espécie *Drosophila mojavensis* o qual revelaram variações importantes nos perfis químicos entre populações geográficas isoladas.

Resultados similares foram encontrados por Dapporto et al. (2004), os quais encontram diferenças quantitativas e qualitativas entre o perfis químicos da cutícula de indivíduos de *Polistes dominulus* de três diferentes localidades e demonstraram que indivíduos de localidades vizinhas apresentaram mais semelhanças em seus perfis epicuticular do que os de localidade mais distante, os autores afirmam ainda que essas semelhanças entre as duas populações vizinhas podem ser atribuída a componentes ambientais e similaridade genética, o que mais uma vez reforça os resultados obtidos aqui, os quais destacam a influência das diferentes condições ambientais, sobretudo, a qualidade de presas disponíveis (Liang e Silverman 2000; Buczkowski e Silverman 2006; Sorvari et al. 2008) e também fatores genéticos (Beye et al. 1998; Suarez et al. 2002; Guerrieri e D'Ettorre 2007; Thurin e Aron 2008) inerentes a cada população.



**Figura 1.** Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação entre diferentes populações geográficas da vespa *M. consimilis*.



**Figura 2.** Curva média para cada grupo de espectros de absorção no infravermelho médio dos gásteres de indivíduos de diferentes populações geográficas de *M. consimilis* com indicação dos picos significativos para separação dos grupos observados.

**Tabela 1.** Número de onda, coeficientes das duas raízes canônicas, grupo funcional, e modo vibracional dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho do gásteres de vespas de diferentes populações geográficas de *M. consimilis*.

Picos	N <sup>o</sup> de onda (cm <sup>-1</sup> )	Raiz canônica 1	Raiz canônica 2	Grupo Funcional	Modo Vibracional
(1)	667	0,609	1,247	Out-of-plane C-H (benzeno)	Dobra
(2)	895	1,247	0,545	Out-of-plane C-H (benzeno)	Dobra
(3)	953	1,264	-0,066	Out-of-plane C-H (benzeno)	Dobra
(4)	1030	1,439	-0,528	In-plane C-H (benzeno)	Dobra
(5)	1076	0,230	1,200	In-plane C-H (benzeno)	Dobra
(6)	1157	-1,327	-0,974	In-plane C-H (benzeno)	Dobra
(7)	1238	1,327	-0,362	-C-N	Estiramento
(8)	1524	1,304	-0,535	-N-H	Dobra

### Agradecimentos

Agradecemos à Fundect pelo Apoio financeiro, a UEMS pelo suporte técnico e ao CNPq pela bolsa de produtividade de William Fernando Antonialli Junior e Luis Humberto da Cunha Andrade.

## Referências Bibliográficas

Antonialli-Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suarez YR. 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera: Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research* 6: 492-499.

Antonialli-Junior WF, Andrade LHC, Suarez YR, Lima SM. 2008. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy *Genetics and Molecular Research* 7: 1-9.

Berven KA, Gill DE, Smith-Gill SJ. 1979. Counter gradient selection in the green frog, *Rana clamitans*. *Evolution* 33: 609-623. In Futuyma DJ, editor. 1992. *Biologia Evolutiva*. 2<sup>a</sup> edição. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética 4: 87-125.

Beye M, Neumann P, Chapuisat M, Pamilo P, Moritz RFA. 1998. Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43: 67-72.

Brown WV, Watson JAL, Lacey MJ, Morton R, Miller LR. 1996. Composition of cuticular hydrocarbons in the Australian harvest termite *Drepanotermes perniger* (Isoptera: Termitidae): Variation among individuals, castes, colonies and locations. *Sociobiology* 27: 81-197.

Buczkowski G, Silverman J. 2006. Geographical variation in Argentine ant aggression behavior mediated by environmentally derived nestmate recognition cues. *Animal Behaviour* 71: 327-335.

Calderón Fernández G, Juárez MP, Monroy MC, Menes M, Bustamante D M, Mijailovsky S. 2005. Intraspecific variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae)

populations from Guatemala based on chemical and morphometric analyses. *Journal of Medical Entomology* 42: 29-35.

Carlin NF, Hölldobler B. 1983. Nestmate and kin recognition in Interspecific mixed colonies of ants. *Science* 222: 1027-1029.

Clément JL, Bagnères AG. 1998. Nestmate recognition in termites. In: Vander Meer RK, Breed MD, Espelie KE, Winston ML, editors. *Pheromone Communication in Social Insects*. 126-155. Boulder, Westview Press.

Crosland MWJ. 1989. Kin recognition in the ant *Rhytidoponera confusa* I. Environmental odour. *Animal Behaviour*, 37: 912-919.

Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, Peeters C. 2001. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *Journal of Insect Physiology* 47: 485-493.

Dahbi A, Lenoir A, Tinaud A, Taghizadeh T, Francke W, Hefetz A. 1996. Chemistry of the postpharyngeal gland secretion and its implication for the phylogeny of the Iberian *Cataglyphis* species (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology* 7: 163-171.

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). *Insectes Sociaux* 51: 279-286.

Etges WJ, Ahrens MA. 2001. Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. V. Deep geographic variation in epicuticular hydrocarbons among isolated populations. *The American Naturalist* 158: 585-598.

Etges WJ, Jackson LL. 2001. Premating isolation determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VI. Epicuticular hydrocarbon variation in *Drosophila mojavensis* cluster species. *Journal of Chemical Ecology* 27: 2125-2149.

Futuyma DJ. *Biologia evolutiva*. 1992. 2ª edição. Riberão Preto: Sociedade Brasileira de genética- SBG, 631p.

Gamboa GJ, Grudzier TA, Espelie KA, Bura EA. 1996. Kin recognition in social wasps: combining behavioral and chemical evidence. *Animal Behaviour* 51: 625-629.

Guerrieri FJ, D'Etorre P. 2007. The mandible opening response: quantifying aggression elicited by chemical cues in ants. *The Journal of Experimental Biology* 211: 1109-1113.

Howard RW. 1993. Cuticular hydrocarbon and chemical communication. D. In: Stanley-Samuelson W, Nelson DR, editors. *Insect lipids chemistry, biochemistry and biology* 176-226. University of Nebraska Press Lincoln.

Jutsum AR, Saunders TS, Cherrett JM. 1979. Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Animal Behaviour* 27: 839-844.

Lahav S, Soroker V, Hefetz A, Vander Meer RK. 1999. Direct behavioral evidence for hydrocarbons as ant recognition discriminators. *Naturwissenschaften* 86: 246- 249.

Lenoir A, D'etorre P, Errard C, Heefetz, 2001. A Chemical ecology and social parasitism in ants. *Annual Review of Entomology* 46: 573-599.

Liang D, Silverman J. 2000. "You are what you eat": Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften* 897: 412- 416.

Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. 2001. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: 136-142.

Mayer E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA. In: Ridley M. 2006. *Evolução*. 3ª edição. Porto Alegre: Arned 13: 375-406

Pirk CWW, Neumann P, Moritz RFA, Pamilo P. 2001. Intranest relatedness and Nestmate recognition in the meadow ant *Formica pratensis* (R.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49: 366-374.

Quinn GP, Keough MJ. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge 320: 9-33.

Ridley M. 2006. *Evolução*. 3ª edição. Porto Alegre: Armed.

Silverstein RM, Webster FX. 2000. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.

Singer TL, Espelie KE, Gamboa GJ. 1998. Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML, Espelie EK, editors. *Pheromone communication in social insects* 104-125. Boulder: Westview.

Skoog DA, Holler JF, Nieman TA. 2002. *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição Porto Alegre: Bookman.

Smith BC. 1999. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Soroker V, Fresneau D, Hefetz A. 1998. Formation of colony odor in Ponerine ant *Pachycondyla apicalis*. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 1077-1090.

Sorvari J, Theodora P, Turillazzi S, Hakkarainen H, Sundsteöm L. 2008. Food resources, chemical signaling, and nest mate recognition in the ant *Formica aquilonia*. *Behavioral Ecology* 19: 441-447.

Suarez AV, Holway DA, Liang D, Tsutsui ND, Case TJ. 2002. Spatiotemporal patterns of intraspecific aggression in the invasive Argentine ant. *Animal Behaviour* 64: 697-708.

Thurin N, Aron S. 2008. Seasonal nestmate recognition in the polydomous ant *Plagiolepis pygmaea*. *Animal Behaviour* 75: 1023-1030.

Vander Meer RK, Morel L. 1998. Nestmate recognition in ants. 79-103. In: Vander Meer RK, Breed M, Winston M, Espelie KE, editors. *Pheromone communication in social insects*, 368. Westview Press Boulder.

Wagner D, Tissot M, Cuevas W, Gordon DM. 2000. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2245-2257.

## CAPÍTULO III

### O papel do perfil de hidrocarbano cuticular de *Mischocyttarus* *consimilis* como estratégia para parasitar colônias de *Mischocyttarus cerberus*

<sup>1</sup>Erika F. Neves, <sup>1</sup>Thiago S. Montagna, <sup>2</sup>Luis. H. C de Andrade, <sup>2</sup>Yzel R. Suárez, e <sup>1,2</sup>William F.

Antonialli-Junior

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Ecologia, Centro Integrado de Análise e Monitoramento Ambiental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados-MS, Brasil.

email:erika\_snakes@yahoo.com.br;thiagomontagna@yahoo.com.br;luishca@uems.br;  
yzel@uems.br;williamantonialli@yahoo.com.br;

#### Resumo

Vários insetos sociais reconhecem seus companheiros de ninho através de sinais químicos, sendo que o perfil químico para cada colônia é específico, adquirido por cada indivíduo, provavelmente logo após a sua emergência. Este trabalho teve como objetivo avaliar se a espécie *Mischocyttarus consimilis* mimetiza o perfil de hidrocarbano de *Mischocyttarus cerberus* como estratégia para parasitar suas colônias. Como método avaliou-se o perfil de hidrocarbano cuticular pelo método de espectroscopia óptica por transformada de Fourier no infravermelho médio por detecção fotoacústica (FTIR-PAS). Foram avaliadas colônias das duas espécies, com e sem interação. Os resultados demonstraram que, pelo método utilizado, as duas espécies possuem nítida distinção entre seus perfis de hidrocarbano cuticulares, quando avaliadas colônias sem nenhum tipo de interação. No entanto, quando avaliadas colônias, as quais continham as duas espécies interagindo, o método aponta que os indivíduos possuem perfis semelhantes. Podemos concluir, portanto, que *M. consimilis*, além de exibir padrões morfológicos e comportamentais similares à *M. cerberus*, o que provavelmente são estratégias que colaboram para o sucesso durante as interações entre as duas espécies, também mimetizam sua assinatura

química, o que deve facilitar ainda mais o comportamento de parasitismo das colônias do hospedeiro.

**Palavras – chave:** Distinção de espécies, assinatura química, interação social.

### **Abstract**

Some social insects recognize nestmates through chemical signals, being that the chemical profile for each colony is specific, acquired for each individual, probably soon after its emergency. This work had as objective to evaluate if the *Mischocyttarus consimilis* species mimics the profile of hidrocarbônico of *Mischocyttarus cerberus* as a strategy for parasite its colonies. As method the profile of hydrocarbon was evaluated to cuticular for the method of optic spectroscopy optic Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy detention (FTIR-PAS). Colonies of the two species had been evaluated, with and without interaction. The results had demonstrated that, for the used method, the two species possess clear distinction enter its profiles of hidrocarbônico cuticles, when evaluated colonies without no type of interaction. However, when evaluated colonies, which contained the two species interacting, the method points that the individuals possess similar profiles that if had grouped. We can to conclude, therefore, that *M. consimilis*, beyond to show standards morphologic and manning similars to *M. cerberus*, what probably they are strategies that collaborate for the success during the interactions between the two species, also mimic its chemical signature, what must still more facilitate the behavior of parasitism of the colonies of the host.

**keywords :** Distinction of species, chemical signature, social interaction.

## Introdução

Vespas eusociais menos derivadas iniciam suas colônias de forma solitária ou agregam-se a outros ninhos estabelecidos ajudando a fundadora, ou ainda, podendo apossar-se dos ninhos que apresente por parte da(s) fundadora(s) baixa motivação defensiva (Nonacs e Reeve 1995).

Vários insetos sociais reconhecem seus companheiros de ninho através de sinais químicos (Gamboa et al. 1996). O perfil químico para cada colônia é específico, sendo adquirido por cada indivíduo logo após a sua emergência, ou entre três primeiros dias (Panek et al. 2001). Segundo Espelie et al. (1990) e Gamboa et al. (1996) os componentes absorvidos do ninho contribuem para assinatura característica da colônia, promovendo o reconhecimento dos indivíduos.

O parasitismo facultativo é uma forma de parasitismo, no qual a rainha é substituída por outra de outra colônia que acaba se favorecendo dos recursos usurpados para sua própria reprodução, sendo descrita em maior número nos Hymenoptera sociais (Wilson 1971; MacDonald e Matthews 1975; Jeanne 1977; Fisher 1987a, b). Este tipo de interação pode ocorrer em espécies de vespas sociais pela atração que os ninhos e a prole exercem sobre outras fêmeas que estejam buscando locais de nidificação (Röseler 1991), representando uma alternativa viável de reprodução, pois o usurpador economiza tempo e esforço na construção do ninho, além de contar com a proteção e a manutenção das operárias (Klahn 1988).

Em vespas sociais o parasitismo facultativo envolvendo a tomada de controle de colônias estabelecidas por fêmeas reprodutivas estranhas, é um tipo de parasitismo social facultativo, que pode ocorrer por uma ou outra forma *intra* ou *interespecífica* (Wilson 1971; Klahn 1988). Ambas as formas foram documentadas em todas as três subfamílias de vespas sociais em *Vespidae* (Wilson 1971). Especificamente em *Polistinae* o parasitismo intraespecífico foi

descrito nos gêneros *Polistes* (*P. metricus* (Klahn 1979); *P. exclamans* (Strassmann 1981) e *Mischocyttarus* (*M. flavitarsus* (Litte 1979)), enquanto, o interespecífico foi descrito somente no gênero *Polistes*, no qual, por exemplo, colônias de *P. instabilis* foram usurpadas por *P. canadensis* (O'Donnell e Jeanne 1991); *P. versicolor* por *P. lanio* (Giannotti 1995); *P. gallicus* por *P. dominulus* (Cervo e Dani 1996); *P. dominulus* por *P. nymphus* (Cervo et al. 2004).

Estudos revelam que algumas espécies de parasitas de insetos sociais conseguem integrar a colônia hospedeira imitando seu odor (revisado por Dettner e Liepert 1994), ou seja, através da aquisição de componentes específicos da espécie hospedeira. Outra estratégia de uso do hidrocarbono por espécies parasitas, tem sido proposta por Lenoir et al. (2001), no qual os parasitas sociais utilizam o “cheiro”, para ocultar sua identidade através de hidrocarbonos cuticulares (HC) quantitativamente reduzidos. Os autores ainda citam a formiga *Polyergus rufescens*, (parasita social do gênero *Formica*), cujo perfil epicuticular parece ser pobre em hidrocarbono no momento em que esta espécie entra no ninho do hospedeiro, podendo representar uma forma do parasita não ser reconhecido pelo hospedeiro (D'Etorre e Errard 1998).

Portanto, o mimetismo químico é uma forma de enganar o hospedeiro, para que a espécie parasita seja bem sucedida (Lorenzi e Bagnères 2002), reforçando a importância do perfil de HC no reconhecimento dos insetos.

*Mischocyttarus cerberus* é uma vespa Neotropical de ocorrência na região centro-oeste e sudeste do Brasil. Esta espécie foi descrita por Richards (1940) e tem sua história de vida mais detalhadamente descrita nos trabalhos de Giannotti (1998); Giannotti (1999); Silva e Noda (2000), Togni e Giannotti (2007) e Togni e Giannotti (2008). Fêmeas de *M. cerberus* compartilham características morfológicas com fêmeas de *M. consimilis*, diferindo tão somente no padrão de coloração do abdômen, sendo totalmente na cor preta em *M. cerberus* e listrado na cor preta e amarelo em cada segmento em *M. consimilis*.

*Mischocyttarus consimilis*, descrita por Zikán (1949) é uma vespa Neotropical de distribuição, desde então restrita ao Paraguai, mas que atualmente têm se dispersado pela região sul do Estado de Mato Grosso do Sul. Relativamente pouco se sabe sobre a história de vida desta espécie considerando que os primeiros trabalhos foram desenvolvidos nos últimos dois anos (Montagna et al. 2009; Montagna et al. 2010).

Em habitats nos quais ambas as espécies estão presentes, a ocorrência de parasitismo facultativo do ninho de *M. cerberus* por *M. consimilis*, parece ser uma regra geral. Portanto, neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar se parasitas facultativas da espécie *M. consimilis* usam como estratégia mimetizar a assinatura química das colônias de *M. cerberus*.

## **Material e Métodos**

Foram coletadas 3 colônias de *M. cerberus* e 3 *M. consimilis* de diferentes regiões (Bodoquena/MS, Baytaporã/MS, Dourados/MS e Piracicaba/SP), sem qualquer indício de interação entre as duas espécies. Destas foram utilizadas de 6 a 10 indivíduos por colônia, dependendo do tamanho da colônia. Assim, avaliando colônias de diferentes populações podemos ter resultados mais confiáveis quanto ao perfil médio de HC destas espécies. Para avaliarmos o efeito do contato físico da espécie parasita com o ninho e com indivíduos da espécie hospedeira, analisamos o perfil de HC de todos os indivíduos de duas colônias parasitadas.

As colônias foram coletadas com auxílio de um saco plástico escuro que foi colocado sobre o ninho, que em seguida foi desprendido pelo pedúnculo. Em seguida todos os indivíduos foram fixados/conservados por congelamento, assim evitando usar qualquer tipo de fixador ou conservante químico que poderia reagir com os elementos químicos da cutícula.

Para análise do HC foram extraídos os gásteres dos indivíduos, e depositados separadamente em placas de Petri. Posteriormente foram colocados em estufa a vácuo por 48 horas para minimizar a umidade. A técnica aplicada foi a Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS segundo Antonialli-Junior (2007 e 2008)).

A técnica (FTIR-PAS) é uma medida da radiação absorvida pela amostra, suas vantagens são muito interessantes para sua aplicação em materiais de grande fragilidade, como materiais biológicos, devido à intensidade da radiação ser baixa não provoca a destruição da amostra, além de, poder ser empregada para medida de amostras com dimensões (Greene et al. 1992).

A FTIR-PAS 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). 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, sendo este, o aspecto mais vantajoso dessa técnica (Smith 1999).

O FTIR-PAS foi realizado diretamente no gáster, pois é nesta região do corpo, onde se concentra os HC (Cuvillier-Hot et al. 2001). Para determinação dos espectros de infravermelho médio das vespas, os gásteres foram colocados no suporte característico da célula fotoacústica, a qual foi purgada com gás Hélio. O espectro resultante para cada gáster foi obtido pela média de 64 espectros com resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ . Posteriormente, foram separadas as linhas de absorção entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , principalmente aquelas relacionadas às vibrações de hidrocarbonos, que podem trazer as informações que se pretende analisar.

A análise de diferenciação das espécies foi realizada utilizando a análise de função discriminante *stepwise*, indicada por selecionar um conjunto de variáveis que melhor diferenciam (caso exista diferença) os grupos analisados (Quinn e Keough 2002). Nesta análise a estatística Wilk's Lambda é utilizada como medida da diferença entre os grupos, 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.

## **Resultados e discussão**

As colônias de *M. cerberus* são fundadas, em geral por uma única fêmea e os ninhos são constituídos por um único favo descoberto preso ao substrato por um único pedúnculo periférico (Giannotti 1998) (Fig.1 A). Por outro lado, segundo Montagna (2010) as colônias de *M. consimilis* também são fundadas, em geral, por uma única fêmea e os ninhos são constituídos por um único favo descoberto preso ao substrato, contudo, por um único pedúnculo centralizado (Fig.1 B)

Em habitats nos quais ambas as espécies estão presentes, a ocorrência de parasitismo envolvendo o parasitismo facultativo do ninho de *M. cerberus* por *M. consimilis*, parece ser uma regra geral. Foi registrado o evento de parasitismo facultativo em três áreas geográficas distintas no estado de Mato Grosso do Sul das quais foram coletadas colônias para as análises de perfis de HC. Em qualquer uma dessas áreas todas as colônias de *M. cerberus* foram parasitadas por fêmeas de *M. consimilis*. Dados preliminares demonstram que o parasitismo ocorre em todos os estágios do desenvolvimento colonial, entretanto, parece ser mais comum no estágio de pré-emergência quando na maioria dos casos uma única fêmea fundadora de *M. cerberus* está presente no ninho (Fig. 1C). Em geral, o parasitismo da colônia no estágio de pré-emergência é executada por uma única fêmea de *M. consimilis* (Fig. 1C), enquanto na pós-emergência há evidências de ações sinérgicas de mais de uma fêmea. O período de tomada de controle da colônia é marcado pelo envolvimento das fêmeas co-específicas em interações antagonistas. Nesses embates físicos fêmeas de *M. consimilis* têm se mostrado mais agressivas que fêmeas de *M. cerberus* e esta interação acaba com a total expulsão da(s) fêmea(s) do ninho da espécie hospedeira (Fig. 1D).

Os trabalhos já desenvolvidos com *M. consimilis* (Montagna et al. 2009; Montagna et al. 2010) sugerem que suas colônias se estabelecem facilmente em habitats colonizados por vespas co-específicas e tornam-se predominantes em detrimento à *M. cerberus*.

Os resultados demonstram que as duas espécies possuem perfis de hidrocarbono distintos entre si (Fig.2), havendo uma separação nítida dos grupos, sendo que a análise de discriminação canônica detectou diferenças significativas entre os espectros no infravermelho-médio das duas espécies (Wilks's Lambda = 0, 033; F=14.551; P<0.001), havendo assim uma separação nítida dos grupos (Fig.2). Isto reforça a importância do perfil de hidrocarbono no reconhecimento de sinais e distinção de espécies, agindo como uma identidade colonial (Howard e Blomquist 2005).

Também obtivemos um diagrama de dispersão dos resultados para diferenciação das espécies, no qual o primeiro eixo da Fig.2 explica 61% dos resultados, e somando-se os dois eixos, explicam 100% dos mesmos, esses resultados foram similares aos encontrados por Antonioli Junior et al. (2007) que estudaram a distinção dos perfis de HC de castas e sexo na formiga *Ectatomma vizottoi*, cuja primeira raiz canônica dos resultados obtidos explicou 67 % da distinção dos grupos.

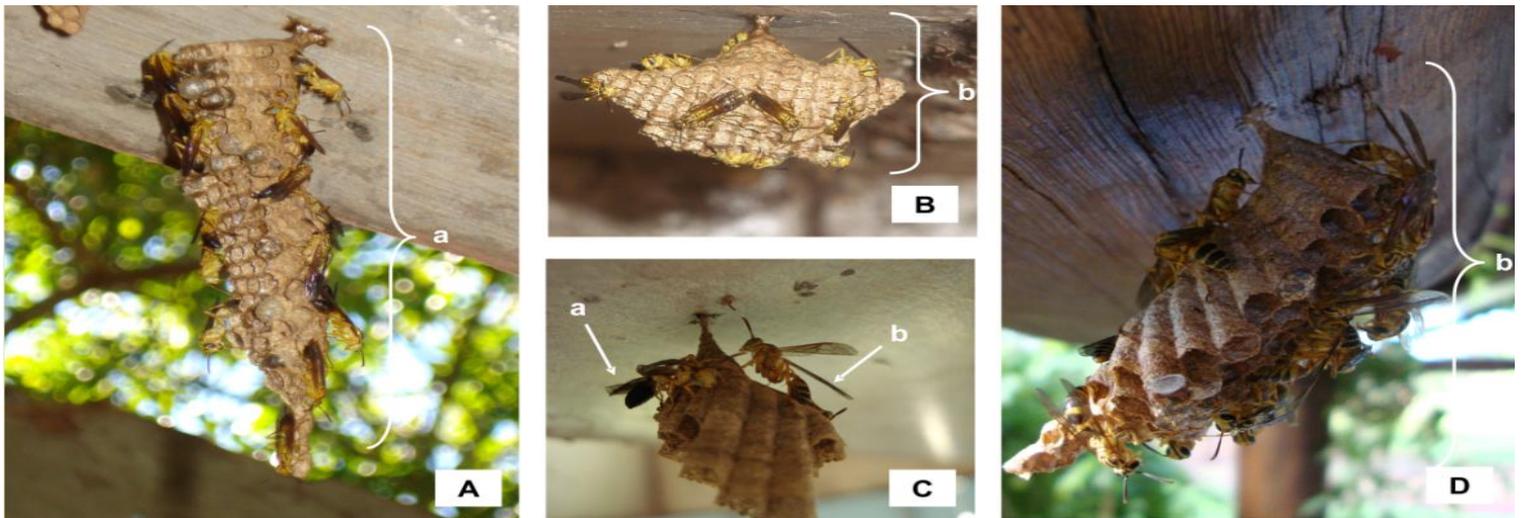
Como demonstrado na tabela 1, a função discriminante stepwise mostrou que os picos mais significantes dos 18 (Fig.3) para as duas raízes canônicas foram 667, 895, 1076, 2877, 2931 2962 e 3082  $\text{cm}^{-1}$ . Essas frequências correspondem ao composto N-H (3082  $\text{cm}^{-1}$ ) e ao hidrocarbono (C-H) (667, 895, 1076, 2877, 2931 2962 e 3082  $\text{cm}^{-1}$ ) (Tabela1.) presentes na cutícula dessas espécies de vespas. Os espectros gerados pela espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio são muito similares, apresentando diferenças sutis (Fig.3), demonstrando que os picos que se apresentaram mais significantes para separação dos grupos foram principalmente aqueles correspondentes a banda do hidrocarbono, (Tabela.1, Fig.2).

Na figura 2 também podemos identificar que a assinatura química dos indivíduos das duas espécies em colônias sob interação são similares, havendo agrupamento dos dados estatísticos. O que nos leva a inferir que possivelmente, a espécie parasita pode adquirir a assinatura química das colônias hospedeiras após os primeiros contatos com elas.

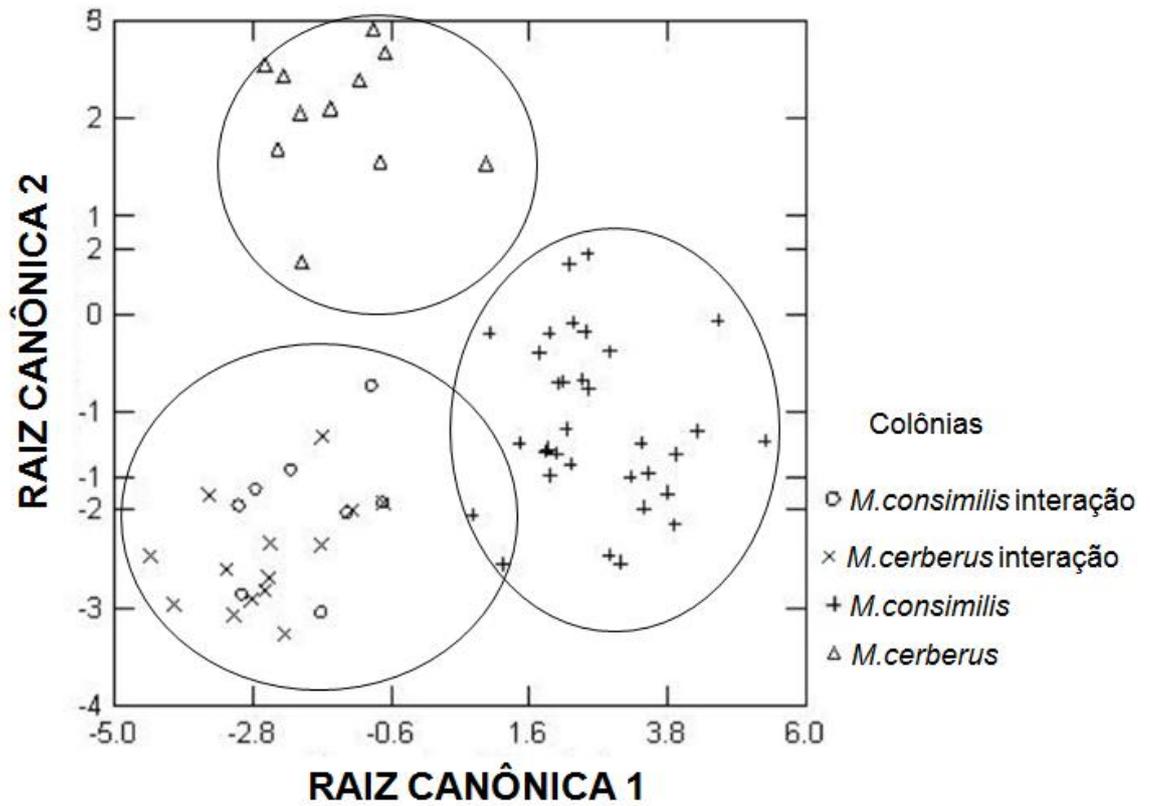
Com relação a este resultado, trabalhos de Lorenzi e Cervo (1992) e Cervo e Lorenzi (1996) sugerem que as fêmeas parasitas adquirem o perfil do hospedeiro mantendo contato com o próprio material do ninho que parece apresentar elementos similares àqueles presentes na cutícula dos indivíduos da colônia. Em espécies do gênero *Polistes* a exposição ao ninho tem demonstrado ser importante para que esses insetos possam reconhecer seus companheiros de ninho (Shellman e Gamboa 1982; Pfennig et al. 1983a, b; Gamboa et al. 1986a, b). Além disso, já se comprovou que os hidrocarbonos presentes na superfície do ninho são encontrados em proporções semelhantes aos da cutícula das vespas que os constroem (Espelie e Hermann 1988, 1990; Espelie et al. 1990; Singer et al. 1992). Dessa forma, os hidrocarbonos do ninho servem como sugestão de sinais químicos que são aprendidos e, possivelmente adquiridos por vespas depois que eles emergem no ninho. Este estímulo químico é utilizado pelas vespas para discriminar as companheiras e as não companheiras de ninho, e também podem ser sinais que são utilizados pelas vespas para reconhecer o ninho natal (Singer e Espelie 1992, 1996).

De fato, Cervo e Lorenzi (1996) descreveram que fêmeas de *P. biglumis* ao invadirem uma colônia hospedeira exibem significativamente uma maior frequência de vibração de seus gáster no ninho. Este comportamento sugere que com esse contato com o envelope a espécie usurpadora possa adquirir odor similar ao da espécie hospedeira, podendo assim mimetizar o perfil de hidrocarbono da colônia e assim serem aceitas pelas operárias que ainda irão emergir. Esses resultados corroboram os de Espelie et al. (1990), nos quais operárias de *P. metricus* foram colocadas em caixas de observações com fragmentos de seu próprio ninho e de ninhos de colônias diferentes, e os indivíduos preferiram descansar no material de seu próprio ninho. No

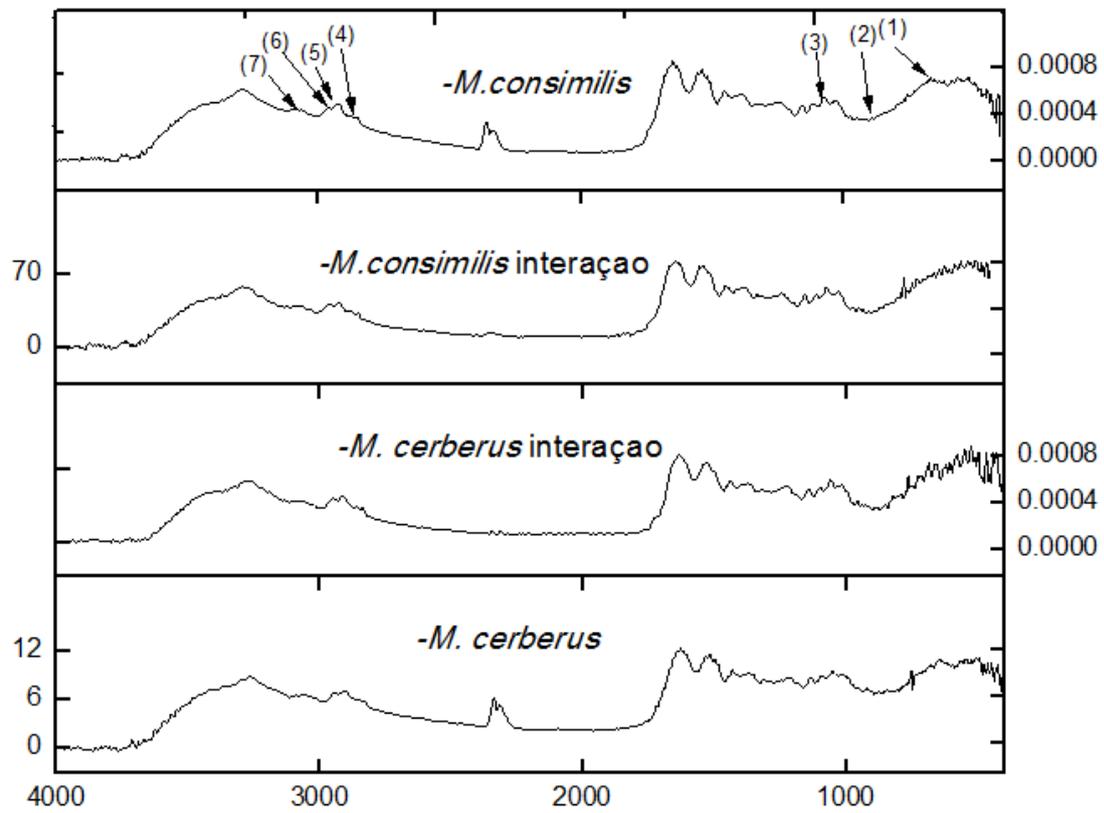
entanto, quando foram extraídos os hidrocarbonos de ambos os ninhos, as vespas não apresentaram preferência alguma, e quando reaplicados os hidrocarbonos, as vespas novamente preferiram ficar em seu ninho natal, o que sugere, que a hipótese é válida e que os hidrocarbonos do ninho servem como sinal de reconhecimento das espécies (Espelie et al. 1990) e podem ser usado como estratégia para mimetizar a assinatura da colônias em casos de parasitismo social.



**Figura 1.** (A) Ninho de *M. cerberus* mostrando o pedúnculo periférico, (B) ninho de *M. consimilis* mostrando pedúnculo centralizado, (C) usurpação do ninho de *M. cerberus* por *M. consimilis* e (D) ninho de *M. cerberus* usurpado sendo totalmente utilizado por *M. consimilis*.



**Figura 2.** Diagrama de dispersão dos resultados da análise discriminante mostrando as duas raízes canônicas de diferenciação das duas espécies de vespa do gênero *Mischocyttarus*, com base nos perfis de HC dos gásteres de *M. consimilis*, *M. cerberus* com e sem interação



**Figura 3.** Curva média para cada grupo de espectros de absorção no infravermelho médio dos gásteres (*M. consimilis* e *M. cerberus*), com indicação dos principais picos observados.

**Tabela 1.** Picos analisados, número de onda, grupos funcionais e modo de vibração dos picos identificados nos espectros de absorção no infravermelho dos gásteres das vespas.

Picos	N <sup>o</sup> de onda (cm <sup>-1</sup> )	Raiz canônica1	Raiz canônica2	Grupo Funcional	Modo Vibracional
(1)	667	1, 706	0, 089	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
(2)	895	1, 124	0, 777	Fora do plano C-H (benzeno)	Dobra
(3)	1076	- 1, 945	-1, 770	No plano C-H (benzeno)	Dobra
(4)	2877	1, 000	0, 560	-C-H(CH <sub>3</sub> )	Estiramento simétrico
(5)	2931	0, 513	1, 780	-C-H(CH <sub>2</sub> )	Estiramento assimétrico
(6)	2962	2, 354	-2, 617	-C-H(CH <sub>3</sub> )	Estiramento assimétrico
(7)	3082	0, 101	-2, 617	-N-H	Estiramento

### Agradecimentos

Agradecemos à Fundect pelo Apoio financeiro, a UEMS pelo suporte técnico e ao CNPq pela bolsa de produtividade de William Fernando Antonialli Junior e Luis Humberto da Cunha Andrade.

## Referências Bibliográficas

Antonialli-Junior WF, Lima SM, Andrade LHC, Suarez YR. 2007. Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizzotoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research*. 6: 492- 499.

Antonialli-Junior WF, Andrade LHC, Suarez YR, Lima SM. 2008. Intra- and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genetics and Molecular Research* 7: 1-9.

Cervo R, Lorenzi MC. 1996. Behaviour in usurpers and late joiners of *Polistes biglumis bimaculatus* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux* 43: 255-266.

Cervo R, Dani FR. 1996. Social parasitism and its evolution in *Polistes*. In: Turillazzi S, West-Eberhard MJ, editors. *Natural history and evolution of paper-wasps*, 98-112. Oxford University Press.

Cervo R, Stemmer C, Castle W, Queller D, Strassmann JE. 2004. Social parasitism of *Polistes dominulus* by *Polistes nimphus* (Hymenoptera: Vespidae). *Insectes Sociaux* 51: 101-108.

Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, Peeters C. 2001. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *Journal of Insect Physiology* 47: 485-493.

Dettner K, Liepert C. 1994. Chemical mimicry and camouflage. *Annual Review of Entomology* 39: 129-154.

D'Ettoire P, Errard C. 1998. Chemical disguise during colony founding in the dulotic ant *Polyergus rufescens* Latr. (Hymenoptera, Vespidae). *Insect Social Life* 2:71-77.

Espelie KE, Wenzel JW, Chang G. 1990. Surface lipids of social wasp *Polistes metricus* Say and its nest and nest pedicel and their relation to nestmate recognition. *Journal of Chemical Ecology* 16: 2229-2241.

Espelie KE, Hermann HR. 1988. Congruent cuticular hydrocarbons: Biochemical convergence of a social wasp, an ant and a host plant. *Biochemical Systematics and Ecology* 16: 505-508.

Espelie KE, Hermann, H. R. 1990. Surface lipids of the social wasp *Polistes annularis* (L.) and its nest and nest pedicel. *Journal of Chemical Ecology* 16: 1841-1852.

Fisher RM. 1987a. Queen-worker conflict and social parasitism in bumble bees (Hym: Apidae). *Animal Behaviour* 35: 1026-1036.

Fisher RM. 1987b. Temporal dynamics of facultative social parasitism in bumble bees. *Animal Behaviour* 35: 1623-1636.

Gamboa GJ, Reeve HK, Ferguson ID, Wacker TL. 1986a. Nestmate recognition in social wasps: the origin and acquisition of recognition odours. *Animal Behaviour* 34: 685-695.

Gamboa GJ, Reeve HK, Pfennig DW. 1986b. The evolution and ontogeny of Nestmate recognition in social wasps. *Annual Review Entomology* 31: 431-454.

Gamboa GJ, Grudzier TA, Espelie KA, Bura EA. 1996. Kin recognition in social wasps: combining behavioral and chemical evidence. *Animal Behaviour* 51: 625-629.

Greene RV, Gordon SH, Jackson MA, Bennett GA. 1992. Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1144-1149.

Giannotti E. 1995. Notes On The Interspecific, Facultative Temporary Social Parasitism Between Two Species Of *Polistes* From Brazil (Hymenoptera, Vespidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 39: 787-791.

Giannotti E. 1998. The colony cycle of the social wasp, *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera, Vespidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 41: 217-224.

Giannotti E. 1999. Arquitetura de ninhos de *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera, Vespidae). *Revista Brasileira de Zoociências* 1: 7-18.

Howard RW, Blomquist GJ. 2002. Ecological behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review Entomology* 50: 371-393.

Jeanne RL. 1977. Behavior of the obligate social parasite *Vespula arctica* (Hymenoptera, Vespidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 50: 541-557.

Klahn JE. 1988. Intraspecific comb usurpation in the social wasp *Polistes fuscatus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 23: 1-8.

Klahn JE. 1979. Philopatric and nonphilopatric foundress associations in the social wasp *Poliste fuscatus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 5: 417-424.

Litte M. 1979. *Mischocyttarus flavitarsis* in Arizona: Social and nesting biology of a polistine wasp. *Zeitschrift Fur Tierpsychologie* 50: 282-312.

Lorenzi MC, Bagnères AG. 2002. Concealing identity and mimicking hosts: a dual chemical strategy for a single social parasite? (*Polistes atrimandibularis*, Hymenoptera: Vespidae). *Parasitology* 125: 507-512.

Lorenzi MC, Cervo R, 1992. Behaviour of *Polistes biglumis bimaculatus* (Hymenoptera: Vespidae) foundresses on alien conspecific nests. In: Billen J, editor. *Biology and evolution of social insects*. 273-279. Leuven: Leuven University Press.

Lenoir A, D'ettore P, Errard C, Heefetz, 2001. A Chemical ecology and social parasitism in ants. *Annual Review of Entomology* 46: 573-599.

MacDonald J, Matthews RW. 1975. *Vespula squamosa*: a yellow jacket wasp evolving towards parasitism. *Science* 190: 1003-1004.

Montagna TS, Torres VO, Dutra CC, Suarez YR, Antonialli-Junior WF, Alves Junior VV. 2009. Study of the foraging activity of *Mischocyttarus consimilis*. *Sociobiology* 53: 131-140.

Montagna TS, Torres VO, Fernandes WD, Antonialli-Junior WF. 2010. Nest architecture, colony productivity, and duration of immature stages in a social wasp, *Mischocyttarus consimilis*. *Journal of Insect Science* (10) 191: 1-11.

Nonacs P, Reeve HK. 1995. The ecology of cooperation in wasps: Causes and consequences of alternative reproductive decisions. *Ecology* 76: 953-967.

O'Donnell S, Jeanne RL. 1991. Interspecific occupation of a tropical social wasp colony (Hymenoptera: Vespidae: Polistes). *Journal of Insect Behavior* 4: 397-400.

Panek LM, Gamboa GJ, Espelie KE. 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.

Pfennig DW, Gamboa GJ, Reeve HK, Reeve JS, Ferguson ID. 1983a. The mechanism of nestmate discrimination in social wasps (*Polistes*, Hymenoptera: Vespidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 13: 299-305.

Pfennig DW, Reeve HK, Shellman JS. 1983b. Learned component of nestmate discrimination in workers of a social wasp, *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). *Animal Behaviour* 31: 412-416.

Quinn GP, Keough MJ. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge 320: 9-33.

Röseler PF. 1991. Reproductive competition during colony establishment. In Ross KG, Matthews RW, editors. *The social biology of wasps*. Ithaca, NY: Cornell University Press, 309-335.

Shellman JS, Gamboa GJ. 1982. Nestmate discrimination in social wasps: the role of exposure to nest and nestmates (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 11: 51-53.

Silva ER, Noda SCM. 2000. Aspectos da atividade forrageadora de *Mischocyttarus cerberus styx* Richards, 1940 (Hymenoptera: Vespidae): duração das viagens, especialização individual e ritmos diários e sazonal. *Revista Brasileira de Zoologia* 2: 7-20.

Singer TL, Camann MA, Espelie KE. 1992. Discriminant analysis of cuticular hydrocarbons of social wasp *Polistes exclamans* Viereck and nest surface hydrocarbons of its nest paper and pedicel. *Journal Chemical Ecology* 18: 785-797.

Singer TL, Espelie KE. 1992. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. *Animal Behaviour* 44: 63-68.

Singer TL, Espelie KE. 1996. Nest surface hydrocarbons facilitate nestmate recognition for the social wasp, *Polistes metricus* Say (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of Insect Behavior*. 9: 857-870.

Strassmann JE, 1981. Parasitoids, predators and group size in the paper wasps *Polistes exclamans*. *Ecology* 62: 1225-1223.

Togni OC, Giannotti E. 2007. Nest defense behavior against the attack of ants in colonies of pre-emergent *Mischocyttarus cerberus* (Hymenoptera: Vespidae). *Sociobiology* 50: 675-694.

Togni OC, Giannotti E. 2008. Nest defense behavior against ant attacks in post-emergent colonies of wasp *Mischocyttarus cerberus* (Hymenoptera: Vespidae). *Acta Ethologica* 11: 43-54.

Silverstein RM, Webster FX. 2000. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 6ª edição. Rio de Janeiro Livros Técnicos e Científicos.

Skoog DA, Holler JF, Nieman TA. 2002. *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição Porto Alegre: Bookman.

Smith BC. 1999. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Wilson EO. 1971. *The Insect Societies*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.

## Considerações Finais

Através das análises de HC pela técnica Espectroscopia Óptica por Transformada de Fourier no Infravermelho Médio por Detecção Fotoacústica (FTIR-PAS) foi possível verificar que os indivíduos mais jovens de *M. consimilis* levam de 3 a 4 dias para adquirirem a assinatura química da colônia e que este perfil varia entre as castas e o sexo, sendo que o perfil de operárias foi mais próximos aos de rainhas, o que provavelmente relaciona-se a maior similaridade de tarefas executadas por esses indivíduos na colônia.

Os perfis de HC de populações que vivem em ambientes similares se agruparam, reforçando o entendimento de que podem ser geneticamente determinados ou adquiridos através do ambiente, como odor da colônia e ou influência da dieta.

Colônias de *M. consimilis* e *M. cerberus* possuem nítida distinção entre seus perfis de HC, concordando com dados encontrados na literatura. No entanto, quando avaliadas colônias, nas quais ocorriam as duas espécies interagindo, os indivíduos apresentaram perfis semelhantes. Dessa forma, *M. consimilis*, além de exibir padrões morfológicos e comportamentais similares à *M. cerberus*, o que provavelmente são estratégias que colaboram para o sucesso durante as interações entre as duas espécies, também mimetizam sua assinatura química, o que deve facilitar ainda mais o comportamento de parasitismo das colônias hospedeiras.

## ***Anexos : Instruções para o envio dos manuscritos à revista científica***

### **Journal of Insect Science *Online Submissions System***

#### **Author Guidelines**

##### **Format for text and citations.**

**Use Rich Text Format (rtf), Times New Roman font, 12 point. Single space. Separate paragraphs with a space. Left justify the text.**

Include e-mail addresses for all of the authors.

Use bold for titles of major sections (Abstract, Introduction, Methods and Materials, Results, Discussion, Acknowledgments, References) and sub sections within major sections.

Use of the passive voice helps to put the focus on what was done rather than the person doing it. For example saying "Smith (1900) has used decapitation to examine the effect of brain factors on egg development" puts the emphasis on Smith. Restating it in the passive voice focuses on the technique used: "Decapitation has been used to examine the effects of brain factors on egg development (Smith, 1900). But there are times when the active voice is more appropriate: "Figure 1 shows the results".

The Methods and Results should be written in the past tense: " "Total RNA was extracted using...." " There was a sharp increase...", but reference to tables and figures is in the present tense: "The data are shown in Table 1" (note that the word data is plural). However, use of the present tense is sometimes appropriate in the Introduction: "The purpose of this paper is...". In

contrast, the past tense is best used in the Discussion as when citing previous work done by others, and in making conclusions from your work.

The past tense is appropriate for scientific reports because the work was done in the past under conditions that existed in the past. Use of the present tense violates the basic scientific assumption that it remains to be seen if the results obtained are repeatable.

Avoid the use of personal pronouns (I, we). Say "The insects were collected." not "I collected the insects." The interest of the reader is what you did, not the fact that you did it, which is obvious from the list of authors. The conclusions drawn from the research should flow directly from the results, not from your opinion of the results. However, personal pronouns are appropriate when you are distinguishing your work from the work of other people: "In contrast to Smith (1980) we found that ...".

Include the taxonomy and authority of the species being studied in both the abstract and text, e.g. *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). The taxonomy and author should not be given for species not used in the study.

The title should include the common name and species name, but not the taxonomy, e.g. the silkworm, *Bombyx mori*, not *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae).

Where possible avoid abbreviations. Species names should not be abbreviated. For example in a paper on the Colorado potato beetle use *L. decemlineata*, not CPB. Do not use *Manduca* for *Manduca sexta*, or *Drosophila* for *Drosophila melanogaster*.

Tables and figures should be included at the end of the text. But tables and figures should also be submitted as Excel and tif documents using the specifications described in the checklist.

**Citation style in the text:**

References in the text should be cited as follows (Smith et al. 2000; Jones 2003; Williams 2005, 2006, 2007). Note the absence of a comma before the year, the use of a semicolon between citations, and that the references are cited in order with the oldest citation first.

Reference style is shown in the examples below.

Please note that journal names should be fully spelled out in the references. Pay attention to the location of periods and commas.

Wigglesworth VB, Beamont JWL. 1950. The respiratory mechanisms of some insect eggs. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 91(4): 429-452.

Tschinkel WR, 2004. Nest architecture of the Florida harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. *Journal of Insect Science*, 4:21, Available online: [insectscience.org/4.21](http://insectscience.org/4.21).

Purcell AH. 2005. *Xylella fastidiosa*- A scientific community Internet resource on plant diseases caused by the bacterium *Xylella fastidiosa*.

Books should be cited as follows:

Zar JH. 1996. *Biostatistical Analysis*, 3rd edition. Prentice Hall.

Articles or chapters in a book should be cited as follows:

Smith WA, Combest WL. 1985. Role of cyclic nucleotides in hormone action. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 8: 263-299. Pergamon Press.

Bekoff M. 1979. Quantitative studies of three areas of classical ethology: social dominance, behavioral taxonomy and behavioral variability. In: Hazlett BA, editor. *Quantitative Methods in the Study of Animal Behavior*, pp. 1-47. Academic Press.

### **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 manuscript is an RTF Microsoft Word document file or a OpenOffice file.
2. The format of the manuscripts usually includes an abstract, introduction, materials and methods, results and discussion. Taxonomic papers and reviews often have a different format. You may include additional abstracts in languages other than English.
3. The text is single-spaced with a 12-point font. Italics, rather than underlining are used for species names. Text lines are numbered.

4. The text adheres to the stylistic and bibliographic requirements outlined above, in Citation Format.
5. All authors are included. E-mail addresses of all authors of the manuscript must be provided. All authors agree to its submission. The manuscript is submitted only to JIS.
6. Key words are different from those in the title.
7. A list of abbreviations with definitions is included. Abbreviations should not be used unless the abbreviation is used repeatedly.
8. Tables are included at the end of the text. Legends are above the table. Explanatory notes are below the table. All tables are also submitted as Excel files.
9. All figures are included at the end of the text, with their legends below the figures. Text figures can be jpg. All figures are also sent as tiff files. All figures have a resolution of at least 350 ppi (pixels per inch) and a width of between 5-6 inches. Color images are in 24 bit RGB or CMYK format. Black and white halftones are in 256 Gray (8-bit grayscale).
10. DNA and RNA and deduced amino acid sequences are submitted in Rich Text Format (rtf) files using Courier font, 10 points. They are not submitted as images.
11. If your files are larger than 25 megabytes in size they can be sent to [jis@insectscience.org](mailto:jis@insectscience.org) using Pando.com (freeware).
12. Videos are submitted as AVI files. Sound files are submitted as WAV
13. If your manuscript is accepted for publication JIS charges an author fee of \$250 to cover the cost of editing and formatting the paper for publication. For those who do not have sufficient funds this fee can be waived, no questions asked.
14. All authors have contributed to the work which can include conception, design, execution, analysis, and interpretation. Acquisition of funding, or general supervision of the laboratory does not confer authorship. Honorary or guest authorship is not acceptable.

The senior author is responsible for the integrity of the work, ensuring that the data obtained from all authors are complete, accurately presented, and interpreted.

15. This paper has not been submitted to another journal.