

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Complejidad del “bouquet” aromático de machos de *Eulaema nigrita* L.
(Apidae: Euglossini) provenientes de fisionomías boscosas y de sabanas del
Cerrado y su relación con el tamaño corpóreo y desgaste alar**

Complexidade do buquê aromático de machos de *Eulaema nigrita* L. (Apidae: Euglossini)
provenientes de fitofisionomias florestais e de savanas do Cerrado e sua relação com o
tamanho corporal e desgaste alar

Kevin Joel Palmera Castrillon

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação
em Entomologia.

Ribeirão Preto - SP

(2021)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

**Complejidad del “bouquet” aromático de machos de *Eulaema nigrita* L.
(Apidae: Euglossini) provenientes de fisionomías boscosas y de sabanas del
Cerrado y su relación con el tamaño corpóreo y desgaste alar**

Complexidade do buquê aromático de machos de *Eulaema nigrita* L. (Apidae: Euglossini)
provenientes de fitofisionomias florestais e de savanas do Cerrado e sua relação com o
tamanho corporal e desgaste alar

Kevin Joel Palmera Castrillon

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Solange Cristina Augusto

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Aline Theodoro Toci

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação
em Entomologia.

Ribeirão Preto - SP

(2021)

Agradecimientos

- ✓ Agradezco primeramente a Dios por la oportunidad de estar aquí.
- ✓ A mi amada Madre Helda Castrillón, por el apoyo incondicional y motivación al iniciar esta aventura.
- ✓ A mi estimada orientadora Prof^{ra}. Dr^a. Solange Cristina Augusto, por el apoyo, la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por todo el cariño recibido durante estos dos años de inmensa experiencia.
- ✓ A mi Coorientadora Prof.^a. Dr^a. Aline Theodoro Toci por sus valiosos aportes y asesoramiento en los análisis químicos.
- ✓ A Thayane Nogueira Araújo, por su apoyo en el análisis de las redes de interacción.
- ✓ A mis colegas del LECA, por el compañerismo y apoyo logístico en campo, en especial a Ana Luisa, Thayane, Danillo, al Dr. Thiago Tosta y al Dr. Léo Correia-Filho.
- ✓ A los funcionarios y colaboradores de la Granja Experimental Glória, Reserva Ecológica del Panga, Hacienda Irara, “Clube Caça e Pesca” y la empresa “Eucatex” por permitir los muestreos en sus áreas de reserva.
- ✓ A los profesores de la Universidad Federal de Uberlândia Dr^a Camila Junqueira, Dr. Mário Machado Martins y al técnico de laboratorio Rodrigo Hipólito por el asesoramiento, disponibilidad y apoyo logístico en los análisis cromatográficos.
- ✓ A Nataly De La Pava por sus comentarios y discusiones en varias etapas de este estudio.
- ✓ A los profesores Dr. Carlos Alberto Garófalo y Dr^a. Camila Junqueira por sus apreciaciones durante la etapa de “relatório” de este trabajo.
- ✓ A Daniel Alvarado, por su aporte en la construcción del mapa del área de estudio.
- ✓ A las funcionarias de USP Renata Cavallari y Vera de Lucca por atenderme siempre en asuntos burocráticos del programa con cariño, paciencia y respeto.
- ✓ A mis colegas del programa de Entomología por los momentos de esparcimiento, conversas y discusiones sobre ciencia.
- ✓ A todos y cada uno de los docentes que me compartieron parte de sus conocimientos a través de sus disciplinas ofrecidas.
- ✓ Al profesor Dr. Carlos Alberto Garófalo por el espacio cedido para horas estudios.

- ✓ A la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por la concesión de la bolsa de estudios (PROEX 88887.337654/2019-00).
- ✓ A mi compañera y amiga, Laura Luna por resistir junto a mí en esta aventura que comencé en el año 2019.
- ✓ A todas las nuevas amistades que gané durante mi estancia en Brasil y que me hicieron sentir como en casa.

Eternamente agradecido com TODOS!

Resumen

PALMERA-CASTRILLON, K.J. **Complejidad del “bouquet” aromático de machos de *Eulaema nigríta* L. (Apidae: Euglossini) provenientes de fisionomías boscosas y de sabanas del Cerrado y su relación con el tamaño corpóreo y desgaste alar.** 2021. Disertación (Maestría) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2021.

Las abejas de las orquídeas (Euglossini) son importantes insectos polinizadores distribuidos en la región neotropical. Los machos de todas las especies colectan compuestos volátiles y semivolátiles a partir de fuentes vegetales, fúngicas y animales para ser almacenadas y acumuladas en estructuras especializadas de las patas posteriores. Posteriormente, tales compuestos son utilizadas durante el “display” sexual de los machos con el fin de atraer hembras conespecíficas para cópula. Se ha propuesto que el perfume de machos euglosinos juega un papel importante como rasgo de señalización sexual involucrado en el aislamiento pre-cópula de especies, especialmente entre linajes simpátricos de origen reciente. Sin embargo, no se conoce sobre el perfil químico del perfume de ninguna especie de este grupo presente en el bioma Cerrado. *Eulaema nigríta* es una especie de euglosino común tanto en fito-fisionomías boscosas como de sabana del bioma. En este sentido, por medio de la técnica de cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC-MS) se identificó la composición del perfume de machos de *El. nigríta* en aras de evaluar diferencias en el perfil químico del perfume en poblaciones de tres áreas de bosque semidecíduo estacional (FG, REP y FIR) y tres áreas de Cerrado *sensu stricto* (CCP, EUC y BR497), así como detectar relaciones entre el perfume y rasgos morfológicos asociados al tamaño y edad de los machos. Los resultados obtenidos indican que existe un bajo efecto de las fito-fisionomías sobre las diferencias en el perfume de los machos colectados, mostrando poca variación en ambos tipos de ambientes. No obstante, al comparar el perfil químico entre áreas, se observaron diferencias significativas entre dos áreas boscosas (REP y FIR), lo que a priori sugiere un efecto del entorno de estas áreas sobre las diferencias en el “bouquet” de los individuos. Por otro lado, análisis de correlación entre rasgos del perfume y rasgos morfológicos mostraron una relación significativa positiva entre la complejidad del perfume y el desgaste alar como medida de la edad. Tal relación corrobora el concepto de las fragancias de individuos viejos como indicadores de la capacidad de sobrevivencia de machos euglosinos.

Palabras claves: *El. nigríta*, perfume, fito-fisionomías, Cerrado, desgaste alar.

Resumo

PALMERA-CASTRILLON, K.J. **Complexidade do buquê aromático de machos de *Eulaema nigrata* L. (Apidae: Euglossini) provenientes de fitofisionomias florestais e de savanas do Cerrado e sua relação com o tamanho corporal e desgaste alar.** 2021. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2021.

As abelhas das orquídeas (Euglossini) são importantes insetos polinizadores distribuídos na região neotropical. Os machos de todas as espécies coletam compostos voláteis e semivoláteis de fontes vegetais, animais e fúngicas para ser armazenadas e acumuladas em estruturas especializadas das pernas posteriores. Essas substâncias são posteriormente utilizadas pelos machos na atração de fêmeas conespecíficas para cópula durante os eventos reprodutivos. Acredita-se que o perfume de machos Euglossini tem um papel importante como traço de sinalização sexual envolvido no isolamento pré-cópula de espécies, principalmente entre linhagens de origem recente que vivem em simpatria. Entretanto, não se conhece sobre o perfil químico do perfume de nenhuma espécie desse grupo presente no bioma Cerrado. *Eulaema nigrata* é uma espécie de Euglossini comum tanto nas fitofisionomias florestais quanto de savana. Neste sentido, através da técnica de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (GC-MS) identificou-se a composição do perfume de machos de *El. nigrata* com o alvo de avaliar diferenças no perfil químico do perfume em populações de *El. nigrata* de três áreas de floresta estacional Semidecidual (FG, REP e FIR) e três áreas de Cerrado *sensu stricto* (CCP, EUC e BR497), além de detectar relações entre o perfume e traços morfológicos associados ao tamanho e idade dos machos. Os resultados obtidos indicam um baixo efeito das fitofisionomias sobre as diferenças no perfume dos machos coletados, mostrando pouca variação em ambos os tipos de ambientes. Mesmo assim, ao comparar o perfil químico entre áreas, diferenças significativas entre duas áreas florestais (REP e FIR) foram observadas, o que a priori sugere um efeito do entorno dessas áreas sobre as diferenças no buquê dos indivíduos. Por outro lado, análises de correlação entre traços do perfume e traços morfológicos demonstraram uma relação significativa positiva entre a complexidade do perfume e o desgaste alar como medida da idade. Essa relação corrobora o conceito das fragrâncias de indivíduos velhos como indicadores da capacidade de sobrevivência de machos Euglossini.

Palavras chaves: *El. nigrata*, perfume, fitofisionomias, Cerrado, desgaste alar.

Abstract

PALMERA-CASTRILLON, K.J. **Complexity of the aromatic bouquet of *Eulaema nigrata* L. (Apidae: Euglossini) males from forested and savanna physiognomies of the Brazilian Cerrado and its relationship with body size and wing wear.** Dissertation (Master) - Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2021.

Orchid bees (Euglossini) are important pollinators insects distributed in the Neotropical region. Males of all species collect volatile and semi-volatile compounds from the plant, fungal, and animal sources to be stored and accumulated in specialized structures of the hind legs. Subsequently, accumulated compounds are used during the male courtship display to attract conspecific females for mating. Male orchid bee perfume has been proposed to play an important role as sexual signaling trait involved in the premating isolation mechanism, especially among recently diverged sympatric lineages. However, the perfume chemical profile of any orchid bee species from the Brazilian savanna biome is unknown. *Eulaema nigrata* is a common orchid bee species in both forested and savanna physiognomies of the biome. In this sense, the chemical composition of *El. nigrata* males perfume was identified to evaluate differences in the perfume chemical profile in populations from three seasonal semi-deciduous forest fragments (FG, REP, and FIR) and three savanna (*Cerrado sensu stricto*) fragments (CCP, EUC, and BR497) using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and to detect relationships between perfume and morphological traits associated with the size and age of males. Results obtained suggest a low effect of the physiognomies on the differences in the perfume from collected males, showing little variation in both types of environments. Nevertheless, when comparing the chemical profile between fragments, significant differences were observed between two forested areas (REP and FIR), which a priori suggests an environmental effect around these areas acting on the individual's bouquet differences. Furthermore, correlation analysis between perfume traits and morphological traits showed a significant positive relationship between perfume complexity and wing wear as a measure of age. This relationship agrees with the hypothesis that older male fragrances are indicators of the survivability of male orchid bees.

Keywords: *El. nigrata*, perfume, physiognomies, Brazilian Savanna, wing wear.

Tabla de contenido

Introducción	1
Justificativa.....	4
Objetivos	5
General.....	5
Específicos	5
Materiales y Métodos	6
Área de estudio	6
Colecta de abejas	8
Extracción y análisis químico de fragancias	8
Desgaste alar	9
Tamaño Corporal.....	10
Análisis de datos.....	11
Evaluación de la composición del “bouquet” de machos provenientes de fito-fisionomías boscosas y de sabanas.....	11
Evaluación de la relación complejidad del “bouquet” versus tamaño corporal y desgaste alar en machos de <i>Eulaema nigrita</i>	12
Redes de interacciones individuo x recurso aromático	12
Resultados	13
Composición del “bouquet” extraído de machos de <i>Eulaema nigrita</i> provenientes de fito-fisionomías boscosas y de sabanas	13
Evaluación de la composición del “bouquet” extraído de machos provenientes de fito-fisionomías boscosas y de sabanas	16
Correlaciones entre la complejidad del “bouquet”, tamaño corporal y desgaste alar	18
Redes de interacciones individuo x recurso aromático para cada fito-fisionomía	19
Discusión	21
Composición del perfume de <i>Eulaema nigrita</i>	21
Efecto del ambiente sobre el perfume de <i>Eulaema nigrita</i>	22
Relación entre el perfume y rasgos morfológicos asociados al “fitness”	24
Redes anidadas en <i>Eulaema nigrita</i>	26
Etapas futuras	27
Referencias Citadas.....	28

Introducción

Las abejas de la tribu Euglossini son un importante grupo de insectos polinizadores con distribución neotropical y diversidad de aproximadamente 240 especies (Moure *et al* 2012). Son comúnmente llamados “abejas de las orquídeas” debido a la fuerte interacción que presentan con flores de más de 700 especies de orquidáceas, además de especies de otras familias (Dressler, 1982; Ramírez *et al* 2002). Según Ramírez *et al* (2010) existen siete zonas de endemismo en Euglossini: América Central, Panamá, Chocó colombiano, Los Andes, Mata Atlántica, Cuenca Amazónica y el Corredor Paraguayo, todas ellas con niveles altos de humedad propicios para la proliferación de euglosinos y plantas asociadas.

Generalmente, para reconocer la diversidad de euglosinos se utilizan trampas de olores que aprovechan la particularidad de los machos de ser atraídos por compuestos aromáticos (Dressler, 1982; Tosta *et al* 2017). Estas abejas adquieren esos compuestos en sus visitas a flores, raíces, hongos, material vegetal en descomposición y hasta en heces, para después almacenarlos en estructuras especializadas ubicadas en sus patas posteriores (Dressler, 1982; Whitten *et al* 1993; Eltz *et al* 2007). De este modo, crean un elaborado perfume o “bouquet” aromático especie-específico utilizado en el cortejo y demarcación de territorios donde se dará la cópula (Stern, 1991). La selección de pareja es ejercida por la hembra, de acuerdo con la cantidad y calidad de los compuestos volátiles del “bouquet” del macho, funcionando como una señal honesta de la capacidad de sobrevivencia de este último (Eltz *et al* 2015).

Es sabido que muchos animales usan señales químicas para identificar y diferenciar posibles parejas sexuales; esas señales normalmente son feromonas producidas a través de diferentes vías metabólicas del organismo (Wyatt, 2003). Sin embargo, la particularidad que tienen los compuestos usados por los euglosinos para atracción de pareja es que gran parte de ellas son colectadas y confeccionadas a partir de diferentes fuentes ambientales, convirtiéndose en una “marca química” entre cada especie (Eltz *et al* 2005).

Aunque se desconoce exactamente cuál es la función de las fragancias de euglosinos en la comunicación química de los mismos, trabajos previos han arrojado evidencias sobre la importancia de éstas como rasgo de señalización sexual implicado en el aislamiento

reproductivo de especies en una escala comportamental (Eltz *et al* 2008), sensorial (Eltz *et al* 2006; Mitko *et al* 2016) y macroevolutiva (Zimmermann *et al* 2009; Weber *et al* 2016). Compuestos terpenoides y aromáticos que conforman tales “bouquet” han demostrado su papel como señalizadores altamente especializados a nivel específico (Eltz *et al* 2006; Eltz *et al* 2008). De hecho, análisis filogenéticos demuestran que las fragancias en euglosinos divergen rápidamente entre especies, principalmente entre linajes de origen reciente que viven en simpatria (Weber *et al* 2016).

Al ser un mecanismo de señalización química con tasas de diferenciación altas (Coyne & Orr, 2004; Smadja & Butlin, 2009; Weber *et al* 2016), y que puede generar variación intra-poblacional por exposición a presiones selectivas, contribuye a la diferenciación de poblaciones simpátricas y posteriores procesos de especiación.

Para que una especie de euglosino obtenga un “bouquet” distintivo necesita inicialmente acumular compuestos a partir de fuentes con disponibilidad variable en tiempo y espacio en el hábitat en que se encuentran. Esto fue demostrado en *Euglossa imperiallis* a través de experimentos de escogencia de fragancias, en donde los machos visitaron fuentes aromáticas de acuerdo con su historial de colecta (Eltz *et al* 2005). Para obtener información del historial de colectas de un individuo existen varias alternativas. Una de ellas es hacer mediciones del desgaste alar, permitiendo deducir el tiempo relativo que un macho invirtió en actividades relacionadas al vuelo (Mueller & Wolf-Mueller, 1993), considerando que mayor desgaste alar representa más actividad de vuelo (Rebêlo & Garófalo, 1991). Debido a que el desgaste alar se encuentra correlacionado positivamente a la complejidad y cantidad de las fragancias en machos euglosinos (Eltz *et al* 2015), esta medida se torna una buena herramienta indicadora de la capacidad de sobrevivencia del individuo y su calidad genética-fenotípica (Eltz *et al* 1999; Eltz *et al* 2015).

De manera similar, existen otros rasgos relacionados al “fitness” que pueden ser empleadas como evidencia indirecta que demuestre el papel de las fragancias como indicadora de la calidad del macho en eventos reproductivos. Uno de los más conocidos es el tamaño corporal, parámetro relacionado al éxito de apareamiento y viabilidad biológica en otros grupos de abejas (Villalobos & Shelly, 1991; Stone *et al* 1995; Alcock, 1996).

A pesar de la conocida importancia de las fragancias de euglosinos en sus eventos reproductivos, poco se conoce sobre el perfil químico del “bouquet” aromático de comunidades presentes en el Cerrado y su rol potencial como mecanismo de aislamiento pre-cópula en poblaciones de fito-fisionomías insertadas en el bioma. La mayoría de los trabajos desarrollados en esta línea han utilizado diferentes especies del género *Euglossa* en formaciones boscosas de otros biomas y con nichos ecológicos aparentemente más restringidos que en especies de otros géneros de euglosinos (Eltz *et al* 1999; Eltz *et al* 2005; Zimmermann *et al* 2009; Pokorny *et al* 2013; Eltz *et al* 2015; Brand *et al* 2020), a excepción de *Euglossa cordata* (Peruquetti *et al* 1999; Tonhasca *et al* 2002).

El bioma Cerrado es un complejo mosaico de vegetación con diferentes fito-fisionomías que reúnen formaciones vegetales diversas, entre boscosas, planicies o sabanas y formaciones campestres (Ribeiro & Walter, 2008). Entre las formaciones boscosas del bioma se encuentra el bosque de ribera y el bosque de galería -fito-fisionomías fuertemente asociadas a cursos de agua-, el bosque seco -dividido en perene, semideciduo y deciduo-, y el “cerradão”. Ya entre las formaciones de sabanas se reconoce un mayor número de fito-fisionomías, destacándose el Cerrado *sensu stricto* y sus diferentes subtipos. Todas las fito-fisionomías de sabanas se diferencian de las presentes en formaciones boscosas por factores edáficos y composición florística, y principalmente por la estructura, estilo de crecimiento y cambios estacionales (Ribeiro & Walter, 2008).

Eulaema nigrata es una especie de euglosino ampliamente distribuida en el Cerrado (Silveira *et al* 2015). Posee alta tolerancia a ambientes con diferentes grados de intervención (Peruquetti *et al* 1999; Tonhasca *et al* 2002) y es considerada una especie común en diferentes fito-fisionomías húmedas del bioma (Tosta *et al* 2017). De hecho, es una de las pocas especies de euglosinos que ocurre frecuentemente en fito-fisionomías más abiertas como aquellas presentes en el Cerrado *sensu stricto*. Como en todas las especies de euglosinos, se estima que *El. nigrata* posee la capacidad de volar grandes distancias, siendo mayor en especímenes de mayor porte (Janzen, 1971; Ackerman *et al* 1982). Al estar presente en todas las áreas del Cerrado estudiadas hasta hoy (Silveira *et al* 2015; Tosta *et al* 2017), se convierte en un modelo eficaz que posibilita reconocer diferencias en el perfil químico de fragancias de euglosinos de poblaciones geográficamente aisladas y con recursos aromáticos variados

de acuerdo con el estado sucesional de cada fragmento. Encontrar una correlación positiva entre la complejidad de la fragancia, tamaño corporal y desgaste alar, apoyaría la idea de la evolución de los aromas a través de la selección sexual ejercida por las preferencias de las hembras.

Justificativa

Biomás húmedos como la Mata Atlántica y la Cuenca Amazónica se conocen por ser áreas con una diversidad de euglosinos alta (Dressler, 1982; Nemésio & Silveira, 2007). Sin embargo, existen fragmentos de bosque húmedo insertados en grandes áreas de sabana del Cerrado brasileño. Este bioma es el segundo más extenso de América Latina (Cardoso & Bates, 2002) y una de las áreas de biodiversidad más importante a nivel mundial en términos de conservación (Myers *et al* 2000). El Cerrado posee comunidades de euglosinos con riqueza de especies (Silveira *et al* 2015; Tosta *et al* 2017) comparable a las encontradas en fragmentos de Mata Atlántica localizados en el sudeste brasileño (Silveira *et al* 2011; Aguiar & Gaglianone, 2012; Giangarelli *et al* 2015). Un tipo de fito-fisionomía húmeda que encontramos en el Cerrado es el Bosque Semidecidual Estacional (“Floresta Estacional Semidecidual” en portugués) el cual representa el 32% de las áreas naturales del Cerrado (Sano *et al* 2009) y una fuente de recursos invaluable para comunidades de euglosinos.

A pesar de que estos fragmentos de bosque semidecidual estacional tienen la misma fito-fisionomía, presentan una composición y riqueza florística única dependiendo de la etapa sucesional en la que se encuentran (Lopes *et al* 2012). Tal singularidad en la flora puede verse reflejada en la diversidad de abejas en un determinado fragmento (Milet-Pinheiro & Schlindwein, 2008), principalmente en comunidades de euglosinos que conservan interacciones con diversas especies vegetales y que son sensibles a variaciones en la flora disponible (Aguiar & Gaglianone, 2014; Ospina-Torres *et al* 2015). Esas variaciones tienen una influencia directa sobre la disponibilidad del recurso aromático ofrecido, y consecuentemente sobre el perfil químico de las fragancias, debido a diferencias en las preferencias de hembras de cada especie en diferentes áreas.

Comprobar y conocer dichas diferencias en el “bouquet” aromático de euglosinos, tomando como modelo a *El. nigrita*, ofrecería herramientas para esclarecer el rol potencial de las fragancias exógenas como mecanismo de aislamiento pre-cópula en poblaciones inmersas en un paisaje fragmentado del Cerrado (Ackerman, 1989; Boughman, 2002; Jackson, 2008). Tales diferencias podrían representar un factor inicial que desencadene en posibles procesos de especiación, caso tal dichas diferencias se intensifiquen en tiempo y espacio.

Objetivos

General

Evaluar si existen diferencias en la composición química de los compuestos volátiles que conforman el “bouquet” aromático de machos de *Eulaema nigrita* provenientes de poblaciones presentes en fragmentos de bosque semidecíduo estacional insertos en el bioma Cerrado y en fragmentos de Cerrado *sensu stricto* y su posible relación con el tamaño corporal y desgaste alar de los individuos, así como evaluar posibles variaciones individuales en estas poblaciones.

Específicos

- 1) Extraer y analizar el “bouquet” aromático de machos de *El. nigrita* de diferentes poblaciones;
- 2) Evaluar si existe diferencia significativa en la composición del “bouquet” extraído de los machos provenientes de fito-fisionomías boscosas y de sabanas;
- 3) Evaluar si hay correlaciones positivas entre la complejidad del “bouquet” de los machos y dos rasgos asociados al “fitness”, tamaño corporal y desgaste alar;
- 4) Comparar las métricas entre las redes de interacción individuo-recurso aromático obtenidas para las fito-fisionomías estudiadas.

Materiales y Métodos

Área de estudio

Se escogieron seis áreas de colecta localizadas en la región del “Triângulo Mineiro” en los dominios del bioma Cerrado (Figura 1); tres fueron fragmentos de bosque semidecuido estacional y otros tres fragmentos eran formaciones típicas de Cerrado *sensu stricto*. Las áreas de bosque semidecuido estacional fueron las siguientes: Granja Experimental Glória (FG) (18° 57' 03" S/ 48° 12' 22" W), Reserva Ecológica del Panga (REP) (19° 10' 04" S/ 48° 23' 41" W) y la Hacienda Irara (FIR) (19° 08' 39" S/ 48° 08' 46" W).

REP posee un fragmento de bosque semidecuido de 16 hectáreas insertado en una formación boscosa contigua compuesta por otros tipos de fito-fisionomías (bosque de galería, “cerradão” y Cerrado *sensu stricto*) que totalizan 409 hectáreas (Cardoso & Schiavini, 2002). FG tiene un área total de 685 ha, la mayor parte utilizada para actividades agropecuarias y con un fragmento de bosque semidecuido de aproximadamente 30 hectáreas que bordea bosques de galería (Lopes *et al* 2011). FIR es una propiedad privada que posee un área de reserva con un fragmento de bosque semidecuido de 22,3 ha e inmerso en un gradiente que incluye “cerradão” y bosque de galería. El fragmento muestra pocas señales de intervención antrópica. Se encuentra rodeado por áreas utilizadas para ganadería y cultivo de soya (Lopes *et al* 2012).

Los muestreos en las áreas de Cerrado *sensu stricto* fueron realizados en las siguientes propiedades privadas: “Clube Caça e Pesca” (CCP) (18°59'20.89"S 48°18'12.57"W), Maderera “Eucatex” (EUC) (19°02'21.3"S 48°05'32.7"W) y un punto localizado entre la vía Uberlândia-Prata en el tramo BR-497 (19°02'04.0"S 48°32'04.6"W). CCP es una reserva privada de 127 ha compuesta principalmente de sabanas arborizadas y pantanos de palmeras (“vereda” en portugués). EUC posee un fragmento de Cerrado de aproximadamente 100 ha, también de carácter privado; se caracteriza por ser un ambiente típico de sabana cercado por un ambiente más boscoso dentro del paisaje general del Cerrado. BR-497 tiene un área de aproximadamente 316 ha, con vegetación predominantemente de sabana e inmerso dentro de una matriz dominada por grandes áreas de monocultivos y pequeños fragmentos boscosos.

El clima de la región es de tipo “Aw” siguiendo la clasificación sugerida por Koppen. El clima es característico de sabana tropical, con inviernos secos y veranos lluviosos. La temperatura promedio del mes más frío es superior a los 18°C (Kottek *et al* 2006).

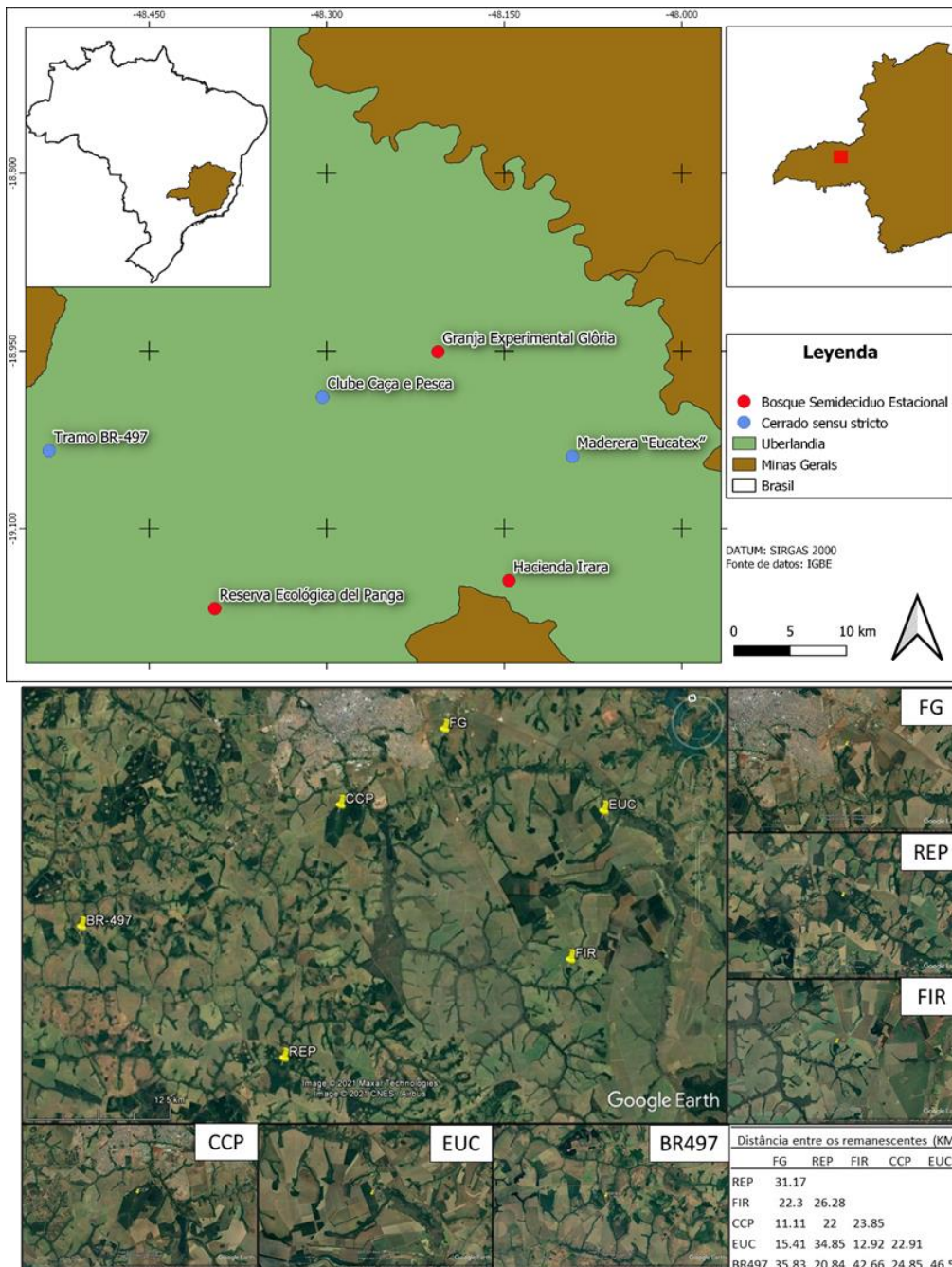


Figura 1. Localización de las áreas de colecta dentro del bioma Cerrado. A- Mapa de localización. B- Imágenes de satélites; las áreas individuales están a una escala de 3.8 km, Fuente: Google Earth.

Colecta de abejas

Del 14 de febrero al 4 de marzo de 2020, las abejas fueron colectadas usando trampas individuales estandarizadas para captura de machos de euglosinos (Eltz *et al* 2005), utilizando el compuesto químico eucaliptol como cebo aromático, siendo esta molécula la más atractiva para machos de *El. nigrita* en muestreos hechos en diferentes regiones del Brasil, incluyendo el área de estudio (Alvarenga *et al* 2007; Tosta *et al* 2017). Para evitar un contacto directo de los individuos con el cebo químico, las trampas fueron cubiertas de una malla y los individuos eran capturados en el momento que llegaban a la trampa. Se colectaron mínimo los diez primeros individuos atraídos por el aroma, de acuerdo con lo implementado por Eltz *et al* (2005). Seguido, los individuos eran enfriados en campo usando hielo y posteriormente sacrificados en un freezer de laboratorio. Con el fin de poder extraer las fragancias sin comprometer la identificación inequívoca de los especímenes, se cortó la pata posterior derecha de cada macho y se colocaron en viales individuales para cromatografía de gases (tipo “Headspace-Crimp”) debidamente sellados.

En estudios donde se extrajo el perfume de machos de euglosinos utilizando el par de patas posteriores, la identificación de los individuos se realizó en campo (Eltz *et al* 2005; Zimmermann *et al* 2009; Pokorny *et al* 2013). Esto puede ser contraproducente cuando se va a analizar especies que, diferente de *Eulaema nigrita*, son difíciles de identificar en campo sin las herramientas necesarias para la correcta identificación taxonómica. Debido que no existe evidencia que demuestre la acumulación diferencial de compuestos formadores del perfume entre el par de patas posteriores de machos euglosinos, se optó por analizar únicamente la pata posterior derecha. Además, durante el comportamiento de colecta, el movimiento de las patas en ambos lados del cuerpo es totalmente sincrónico (Kimsey, 1984), por lo que los productos del perfume presentes en la corbícula derecha serían exactamente los mismos que los de la corbícula izquierda.

Extracción y análisis químico de fragancias

Todo el análisis químico fue realizado en las instalaciones de la “Escola Técnica em Saúde” – ESTES de la Universidad Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. La

extracción del perfume se hizo a través del método “headspace” directo, inyectando cada una de las muestras directamente dentro de un utilizando un muestreador “headspace” automático modelo Agilent 769A equipado al cromatógrafo de gases.

Posteriormente, cada vial fue sometido al proceso de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), usando una columna HP-5 MS no polar (marca Agilent, longitud de 30 m, diámetro interno de 0.25 mm, espesura de la capa de 0.25 μm) y un detector de masas selectivo modelo 5577E (©Agilent Technologies, Santa Clara, California, United States). El equipo fue programado según las especificaciones empleadas para análisis químico de compuestos volátiles y semivolátiles en euglosinos (Eltz *et al* 1999; Eltz *et al* 2005; Zimmermann *et al* 2009; Eltz *et al* 2015) con algunas modificaciones en la temperatura del horno. La inyección de las muestras no fue dividida; el horno se programó con un temperatura inicial de 40°C, aumentando a una tasa de 3°C/min hasta llegar 150° y posteriormente hasta 250°C a un ritmo de 5°C/min. Los índices de retención asociados a cada pico cromatográfico y los espectros de masas fueron comparados y referenciados con aquellos espectros registrados en las bibliotecas de compuestos de Adams (2017) y NIST (2017). Se excluyeron de los análisis posteriores lípidos e hidrocarburos alifáticos derivados de secreciones de las glándulas labiales-cefálicas de las abejas y que normalmente se encuentran mezclados con las fragancias exógenas de las patas posteriores (Eltz *et al* 2005; Eltz *et al* 2007; Zimmermann *et al* 2009; Eltz *et al* 2015; Brand *et al* 2020).

Desgaste alar

A cada individuo se le hizo una evaluación del desgaste alar a través de dos métodos: 1) utilizando las categorías sugeridas por Rebêlo & Garófalo (1991) (Figura 2); y 2) usando el análisis de porcentaje de desgaste alar empleado por Pacheco (2018) con algunas modificaciones. En la evaluación se contó el número de muescas en los márgenes de cada lado de las alas anteriores, excluyendo individuos que hayan sufrido daño alar visible durante o después de ser capturados. Para el análisis de porcentaje de desgaste alar, se tomaron medidas del área total de cada ala anterior (Figura 3A) utilizando el programa ImageJ® (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2014) y posteriormente se calculó el área faltante debido al desgaste (Figura 3B). Para el cálculo del porcentaje de desgaste se empleó la siguiente ecuación: % =

$[(DaD+DaI)*100]/(AD+AI)$, donde DaD y DaI es el desgaste alar del ala derecha e izquierda respectivamente; AD y AI representan el área total de cada ala. Las categorías de porcentaje de desgaste serán las empleadas por Pacheco (2018).

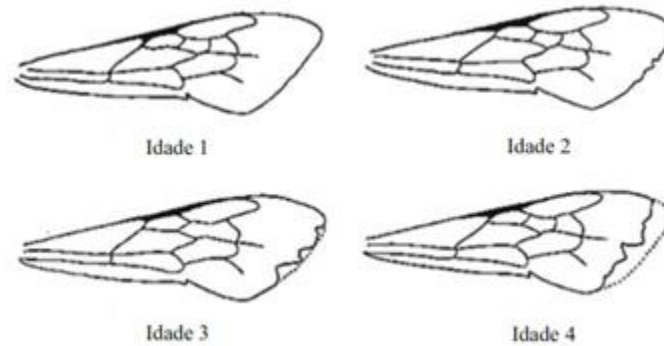


Figura 2. Categorías del desgaste alar relacionadas con la edad de los machos euglosinos según Rebêlo e Garófalo (1991).

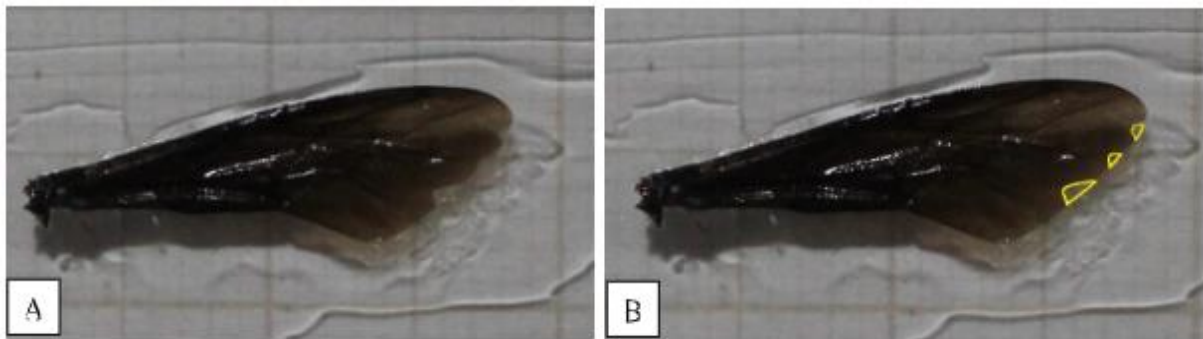


Figura 3. A) ala derecha de macho de *Eulaema nigrita* con desgaste alar; B) ala derecha de macho de *El. nigrita* marcando el área de desgaste alar para cálculo de porcentaje. Tomado de Pacheco (2018)

Tamaño Corporal

Fue extraída la cabeza de cada individuo y pegada cuidadosamente sobre laminas portaobjetos para microscopia (Figura 4A). Cada lamina fue fotografiada con la cabeza del individuo dirigida hacia el lente de la cámara fotográfica. A partir de las fotos, se tomaron medidas de la anchura máxima de la cabeza (Figura 4B) usando el programa de procesamiento y análisis de imágenes ImageJ® (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2014).

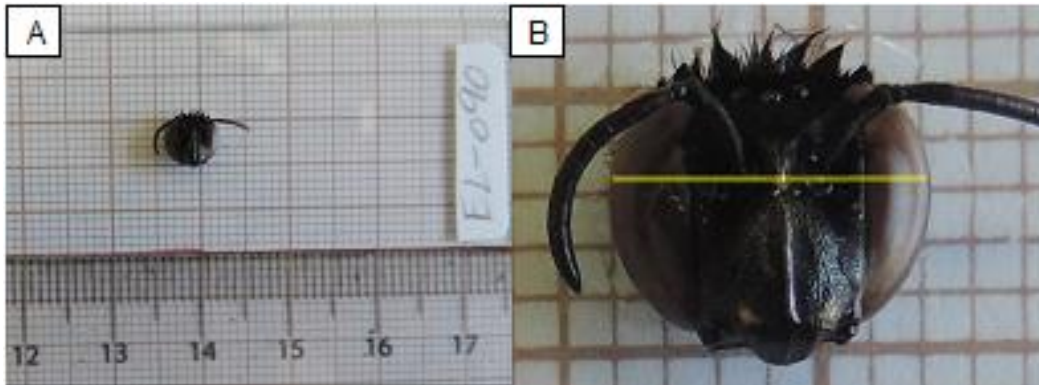


Figura 4. A) Cabeza de un macho de *Eulaema nigrita*; B) Amplitud máxima de la cabeza, parámetro utilizado para comparación del tamaño corporal entre machos euglosinos.

Análisis de datos

Evaluación de la composición del “bouquet” de machos provenientes de fito-fisionomías boscosas y de sabanas

Para visualizar diferencias en el “bouquet” de los machos presentes en cada área de cada fito-fisionomía muestreada, se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (“nMDS”). Para tal propósito, las áreas de los picos absolutos de cada cromatograma fueron estandarizadas con el fin de representar contribuciones relativas de los picos a las muestras individuales (Eltz *et al* 2005). A partir del conjunto de datos, se construyó una matriz de similitud basada en el índice Bray-Curtis (Legendre and Legendre, 1998). Las similitudes fueron ordenadas en un gráfico bidimensional. En los gráficos “MDS” los puntos representan distancias entre ellos que coinciden exactamente con el orden de rango de las disimilitudes entre las muestras provenientes de la matriz de similitud subyacente. Las desviaciones de esta coincidencia se expresan en términos de “estrés”, donde valores <0.15 indican que el gráfico es una buena representación de la estructura general de la matriz (Clarke & Warwick, 2001).

Para comprobar si existe un efecto de la fito-fisionomía o de algunos de los fragmentos muestreados sobre las similitudes del perfume, se utilizó la prueba de permutación ANOSIM con diseño cruzado de una vía (Clarke & Green, 1988). La

identificación de los compuestos responsables de crear los patrones de similitud/disimilitud se hizo a través del algoritmo SIMPER, el cual muestra la contribución porcentual de cada compuesto a la similitud general dentro de cada población. El índice pesa tanto el alcance como la consistencia (en comparaciones entre pares de muestras) por el cual cada compuesto contribuye a la similitud general (Clarke & Warwick, 2001). Todos los análisis fueron realizados con el programa RStudio 3.5.1 (Team, 2018) usando los paquetes “permute” (Simpson *et al* 2019), “lattice” (Sarkar *et al* 2018), “vegan” (Oksanen *et al* 2018), “mgcv” (Wood 2020), “nlme” (Pinheiro *et al* 2018) y “labdsv” (Roberts 2019).

Evaluación de la relación complejidad del “bouquet” versus tamaño corporal y desgaste alar en machos de *Eulaema nigrita*

Con el propósito de verificar si hay efecto del tamaño y desgaste alar sobre la complejidad y cantidad del perfume, se utilizaron correlaciones de rangos de Spearman. Para verificar si existe correlación entre los parámetros del perfume, se realizará una correlación de Pearson.

Redes de interacciones individuo x recurso aromático

Con el fin de evaluar posibles variaciones individuales dentro de cada población con relación al recurso aromático colectado, se adaptó la técnica de redes de interacción individuo-recurso alimenticio empleada en estudios de especialización individual (Heinrich 1976; Bolnick *et al* 2003). Generalmente, estas redes individuo-recurso son útiles para evaluar patrones de uso de recursos dentro de las poblaciones, pero enfocado a modelos de preferencia alimentar (Araújo *et al* 2008; Araújo *et al* 2009; Araújo *et al* 2011). Las redes fueron construidas a partir de una matriz individuos-compuestos químicos, donde las filas representaban los individuos y las columnas a los compuestos. Las celdas representaron datos cuantitativos del área bajo cada pico cromatográfico (corriente de iones integrada) transformados a logaritmo como cantidades relativas, pero asemejando a las matrices hechas para redes de interacciones individuo-recurso alimenticio (Harary 1969; Bascompte *et al* 2003). Los parámetros de Conectividad (C), Anidamiento (N) (Araújo *et al* 2009; Pires *et al* 2011), Modularidad (M) y grado de especialización de la Red (H_2') fueron calculados para las redes de interacción.

C es la proporción de enlaces presentes según todas las posibilidades; valores de conectividad bajos representan una mayor diferenciación de nicho entre individuos (Pires *et al* 2011). Se calculó el valor de N a través del índice NODF/100; el valor varía de 0 a 1, donde 0 representa redes no anidadas y 1 redes completamente anidadas (Araújo *et al* 2009; Pires *et al* 2011). El valor de M fue calculado a partir del índice de optima modularidad (Newman, 2006) el cual también varía de 0, cuando están organizados al azar, a 1, cuando todas las interacciones se dan únicamente dentro de módulos (Tinker *et al* 2012). H_2' se refiere a la exclusividad de las interacciones entre individuos-recursos en las redes (Blüthgen & Klein, 2011) y fue medido de acuerdo con la ecuación sugerida por (Blüthgen *et al* 2006). Valores de H_2' varían de 0 (individuos generalistas) a 1 (individuos especialistas).

Para verificar la significancia de los valores calculados de cada parámetro, se construyeron modelos nulos (1000 aleatorizaciones) para cada población y en conjunto. Posteriormente se calculó el promedio e intervalo de confianza (IC) del 95% de cada aleatorización. Fueron considerados como significativos los valores observados mayores a los calculados con los IC del 95%. Para comparar los valores de los parámetros anidamiento, modularidad y grado de especialización entre individuos de cada fito-fisionomía, se calculó el tamaño de efecto estandarizado (SES) de acuerdo con la ecuación:

$$SES = \frac{\text{Valor observado} - \text{Media}_{NULL}}{DE_{NULL}}$$

Los análisis fueron hechos utilizando los paquetes “RInSp” (Zaccarelli *et al* 2013) y “Bipartite” (Dormann *et al* 2008; Dormann *et al* 2009; Dormann 2011) incorporados a la versión del programa RStudio mencionado anteriormente.

Resultados

Composición del “bouquet” extraído de machos de Eulaema nigrita provenientes de fito-fisionomías boscosas y de sabanas

Las fragancias de los individuos fueron altamente variables en términos de complejidad, registrándose “bouquets” desde cuatro a 45 compuestos diferentes; se identificó

un total de 61 compuestos. No se encontró correlación entre el número de compuestos y cantidad de fragancias de los individuos (Spearman $R=0.095$, $p>0.05$, $N=65$).

La Tabla 1 muestra una representación cuantitativa de los 61 compuestos exógenos identificados en el perfume de todos los individuos de cada área. Es evidente que gran parte de los compuestos tendieron a ser compartidos entre individuos presentes en dos o más áreas, con diferencias sólo en las proporciones relativas de varios de ellos. Por ejemplo, el monoterpeno Sabineno fue un compuesto altamente presente en el perfume de individuos de las áreas REP, FIR y BR497, pero que también ocurrió en las otras tres áreas como compuesto minoritario. Situación parecida se dio con el alquilbenceno m-Cimeno y los monoterpenos oxigenados óxido de trans-carvona y timol metil éter. Compuestos exclusivos de alguna área fueron escasos, destacándose el sesquiterpeno β -bisaboleno como traza en el perfume de individuos del área CCP. También hubieron compuestos presentes como minoritarios o trazas en individuos de varias áreas, pero ausentes en otras como los sesquiterpenos α -Farneseno, Germacreno B y δ -elemeno.

Tabla 1. Abundancia relativa promedio de compuestos presentes en las fragancias de los 65 machos de *Eulaema nigrita* colectados en 6 áreas localizadas en el bioma Cerrado, clasificados en sentido ascendente según su tiempo de retención (RT) en una columna capilar no polar DB-5.

Compuestos	RT (min)	FG (n=11)	REP (n=10)	FIR (n=11)	CCP (n=11)	EUC(n=11)	BR497 (n=11)
Etilbenceno	8,5	0,058	-	-	-	-	-
β -Thujene	11,6	0,030	0,937	0,126	0,786	0,024	0,043
α -Thujene	11,7	0,270	0,694	0,325	0,113	1,122	0,057
α -Pino	11,8	1,311	1,847	0,864	1,671	1,989	2,220
Canfeno	12,5	0,113	0,330	0,222	0,078	0,115	-
Sabineno	13,9	2,016	11,364	7,437	1,695	2,264	7,135
β -Pino	14	1,661	-	2,360	1,326	0,771	0,012
trans-2-Octen-1-Ol	14,4	0,031	0,051	0,098	-	-	0,373
β -Mirreno	15	0,645	0,791	0,243	0,312	0,267	1,433
p-Mentatrieno	15,5	1,309	1,444	1,372	0,940	2,102	4,538
3-Careno***	15,8	-	1,442	-	0,144	2,112	-
p-Cimeno	16,2	0,408	1,652	1,428	3,349	1,303	2,800
m-Cimeno	16,5	3,880	7,229	6,119	7,560	4,764	10,102
o-Cimeno	16,6	2,392	3,849	2,049	0,912	4,111	3,292
Limoneno*	16,7	34,032	34,311	11,850	12,236	26,640	22,955
Eucaliptol	16,8	4,028	4,191	32,069	28,851	15,175	14,986
cis-Ocimeno	17,9	0,006	-	0,079	-	-	0,131
γ -Terpineno	18,3	2,479	4,228	3,595	3,013	3,584	4,013
p-Cresol	19,3	0,046	0,281	0,251	0,332	0,919	0,618
m-Cresol	19,4	0,931	0,482	0,324	0,412	0,493	0,133

Continuación Tabla 1.

Compuestos	RT (min)	FG (n=11)	REP (n=10)	FIR (n=11)	CCP (n=11)	EUC(n=11)	BR497 (n=11)
meta-Cymenene***	19,5	0,069	0,032	-	0,019	0,027	-
Terpinoleno	19,8	0,702	4,459	1,351	2,536	0,753	0,738
Benceno, 1-metil-4- (1-metiletenil) -	19,9	1,019	0,755	1,269	1,293	2,429	3,280
Nonanal	20,8	0,246	0,036	0,445	0,010	0,062	0,192
trans-isocarveol	22,3	0,311	-	0,037	0,236	0,219	0,098
Veratrole***	22,9	0,166	0,058	0,021	0,121	-	0,132
Desconocido A1*	24,2	2,014	2,795	2,411	1,252	2,095	3,964
Naftalina	24,3	-	-	0,616	-	0,261	0,094
α -Terpineol	24,9	0,093	0,069	0,057	0,035	0,246	0,169
cis-Dihydrocarvona	25,1	0,252	-	-	0,105	0,178	-
trans-Dihydrocarvona	25,5	0,210	-	0,046	0,312	0,340	-
Carvona	27,3	0,378	0,127	0,082	0,608	0,527	0,088
Óxido de trans-carvona	28,3	6,427	0,342	0,667	4,169	4,824	0,558
Indol	29,6	2,124	1,741	1,220	2,336	1,281	2,614
Timol metil éter	31,1	5,371	0,600	4,462	12,313	5,234	0,453
γ -Elemene***	31,6	0,080	0,259	-	0,108	0,320	-
δ -Elemene**	31,6	-	0,046	-	0,545	0,072	-
Copaeno*	33,3	0,410	0,883	0,759	0,381	0,677	0,354
Isoquinoleína	33,6	-	0,092	4,125	1,204	0,787	5,794
Escatol***	33,7	20,196	6,812	-	3,923	0,100	-
β -Cubebene**	33,9	0,008	0,087	0,040	0,070	0,070	0,057
β -Elemene	34	0,200	0,375	0,585	0,529	6,193	1,515
beta-Cariofileno	35,1	1,475	1,837	4,081	1,883	3,176	2,608
beta-Copaeno	35,5	0,041	0,029	0,142	0,046	0,079	0,067
trans-alpha-Bergamoteno	35,8	0,057	0,009	0,049	0,027	0,166	-
Selina-5 11-dieno	36,1	0,024	0,086	0,363	0,092	0,031	0,041
Humuleno	36,5	0,480	1,578	0,958	0,295	0,204	0,569
9-epi-E-Cariofileno	36,8	0,020	0,098	0,181	0,067	0,012	0,035
cis-Muurolo-4 (15) 5-dieno	36,9	0,011	0,016	0,190	0,037	-	0,056
γ -Muuroloeno	37,5	0,346	0,354	0,330	0,185	0,196	0,095
β -Selinen	37,8	0,046	0,014	0,111	0,166	0,187	-
α -Muuroloeno	38,5	0,108	0,084	0,388	0,082	0,127	0,217
α -Farneseno	38,8	0,269	0,202	1,632	0,046	-	-
β -Bisaboleno	38,8	-	-	-	0,175	-	-
γ -Cadineno	39	0,350	0,175	0,652	0,396	0,275	0,271
cis-Calamenene**	39,3	-	0,216	0,152	-	0,516	0,482
δ -Cadineno	39,4	0,514	0,547	1,181	0,547	0,394	0,353
Cubeneno*	39,7	0,008	0,059	0,088	0,008	0,068	0,044
α -Cadineno	39,9	0,016	0,002	0,188	0,031	0,010	0,059
Germacreno B	40,6	0,304	-	0,163	0,052	0,087	-
Cadalene	45,8	0,010	0,003	0,150	0,031	0,022	0,160

Nota: se analizaron fragancias de 11 machos por cada sitio (excepto REP con 10 individuos). Los colores indican cuánto contribuyó un compuesto en promedio al área total del pico en individuos de cada área muestreada. los compuestos se clasifican como mayoritarios (rojo, >5% del área total del pico), minoritario (naranja, 1–5%) y trazas (amarillo, <1%). Los asteriscos (*) indican los compuestos que contribuyeron significativamente a las diferencias en el perfume entre individuos de los sitios REP y FIR según el algoritmo SIMPER.

Evaluación de la composición del “bouquet” extraído de machos provenientes de fitofisionomías boscosas y de sabanas

La figura 5A muestra un gráfico de escalamiento multidimensional no métrico en dos dimensiones (nMDS) donde la distancia entre los puntos refleja la disimilitud química entre individuos. El gráfico nMDS no mostró una separación visual clara de los grupos de individuos de cada área. Cabe aclarar que la vista bidimensional del gráfico es una representación imperfecta (valor de estrés=0.21) de la verdadera distinción entre individuos en la matriz de similitud multidimensional. El modelo explica un 83% de la varianza de los datos ajustados ($R^2 = 0.83$).

El análisis de permutación ANOSIM sugiere diferencias significativas en el perfil químico de al menos uno de los seis fragmentos estudiados ($p < 0.05$), aunque el poder explicativo del modelo fue muy bajo ($R = 0.06$; $N = 65$).

Las diferencias se debieron a la variación en las proporciones relativas en 12 de los 49 compuestos que representan el 99.5% de la disimilitud del perfume entre individuos provenientes de las áreas REP y FIR, según el algoritmo SIMPER (Tabla 1). Menos de la mitad de los 12 compuestos responsables de las diferencias estadísticas en el perfil químico estuvieron presentes en una de las dos áreas. Entre los que contribuyeron significativamente a la disimilitud del perfume destacan los monoterpenos 3-Careno, Limoneno, los sesquiterpenos γ -Elemeno, cis-Calameneno, δ -Elemeno, Copaeno, Cubeneno y los compuestos aromáticos Escatol, Veratrole, meta-Cimeneno y β -Cubebeno. La mayoría de estos compuestos son comunes en el perfume de euglosinos (Eltz *et al* 1999; Eltz *et al* 2005; Zimmermann *et al* 2009), por lo que es probable que la diferenciación química entre individuos de distintas áreas se produzca principalmente por variaciones en las cantidades específicas de dichas sustancias.

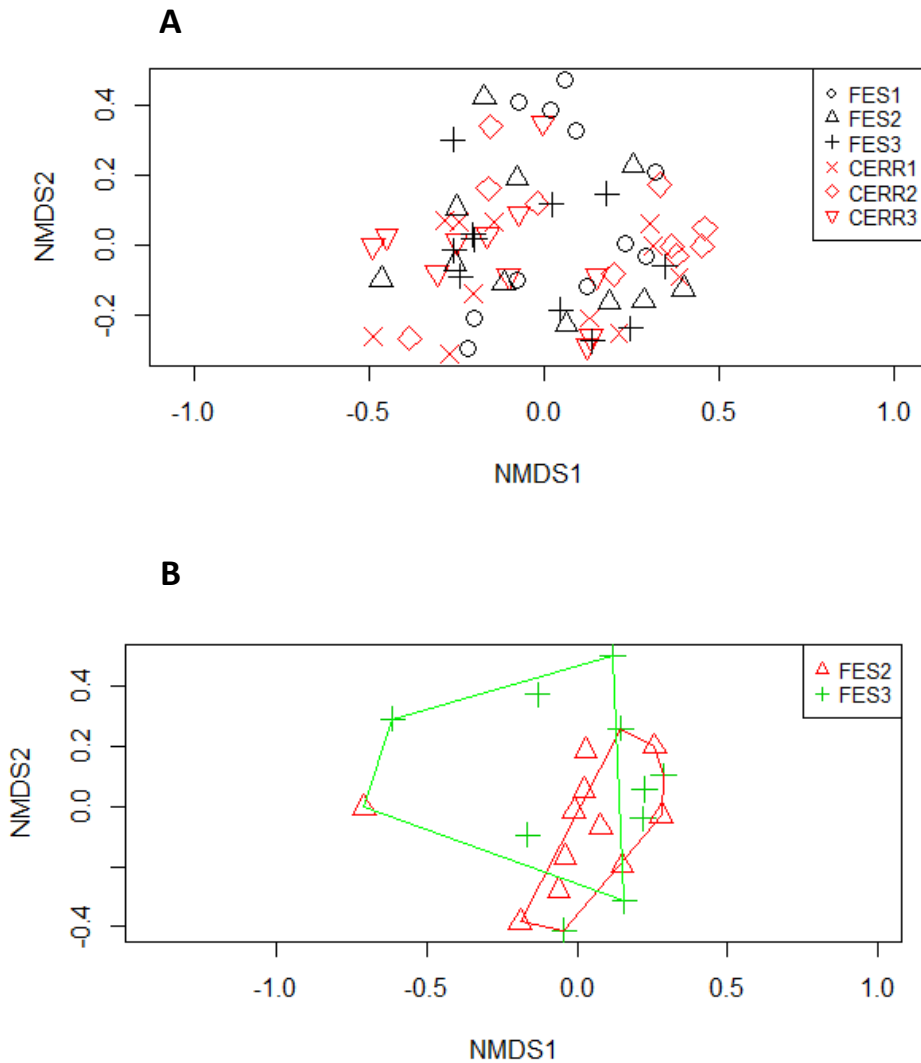


Figura 5. Representación bidimensional de la similitud/disimilitud de las fragancias de 65 machos de *Eulaema nigrita* colectados en los dominios del bioma Cerrado. (A) gráfico escalado multidimensional no métrico (nMDS) basado en el índice Bray-Curtis (estrés=0.21) en las 6 áreas de colecta. Los ejes son dimensiones de distancias simples sin unidades; la distancia/proximidad entre los puntos representa la disimilitud/similitud química de las fragancias individuales. (B) gráfico nMDS visualizando únicamente las muestras de FES2 y FES3 (estrés=0.12). Nota: FES1: FG; FES2: REP; FES3: FIR; CERR1: CCP; CERR2: EUC; CERR3: BR-497.

Correlaciones entre la complejidad del “bouquet”, tamaño corporal y desgaste alar

Ningunos de estos rasgos del morfológicos estuvieron relacionados a la cantidad del perfume en ninguna de las poblaciones (Tabla 2). En cuanto a la complejidad del perfume, las medidas de desgaste alar mostraron una correlación positiva en todas las poblaciones (Figura 6-B).

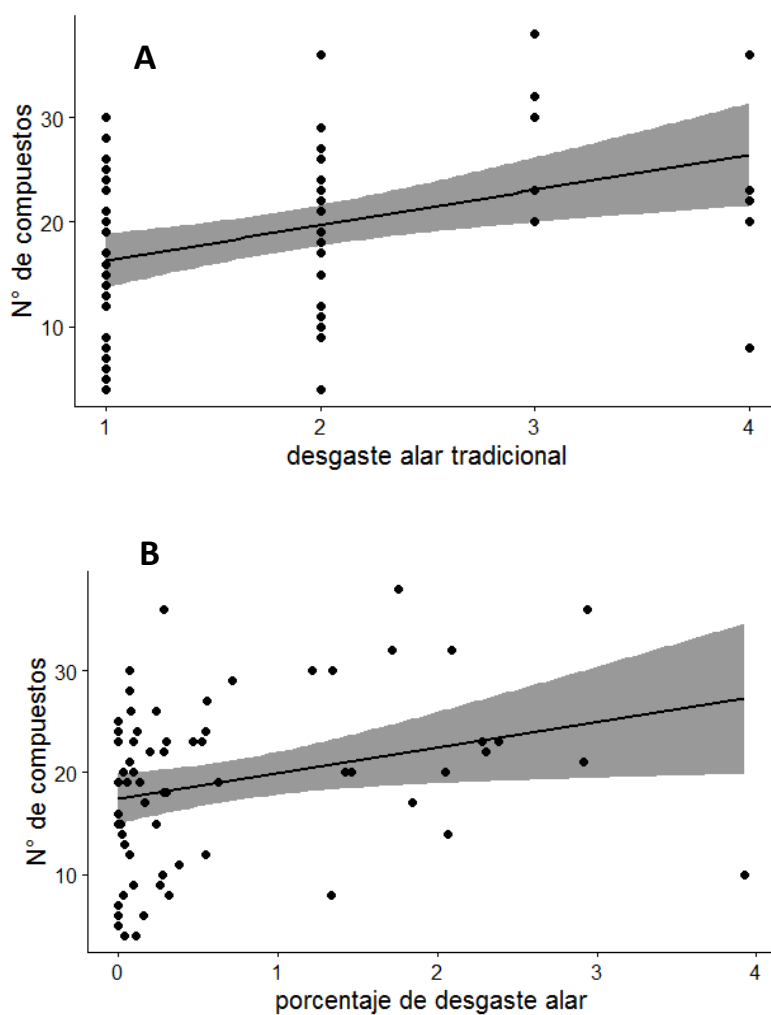


Figura 6. Relación entre las medidas de desgaste alar (A - Desgaste tradicional; B - Porcentaje de desgaste alar) y el número de compuestos en el perfume de machos de *Eulaema nigrita* colectados en fito-fisionomías boscosas y de sabana del bioma Cerrado. Valores de la correlación son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de los análisis de correlación de Spearman entre las variables del perfume (cantidad y complejidad) y variables morfológicas calculadas a partir de machos de *Eulaema nigrita* capturados en fito-fisionomías boscosas y de sabana del bioma Cerrado.

Variable A	Variable B	N	Spearman R	p
Cantidad	Desgaste tradicional (Rebêlo & Garófalo, 1991)	65	-0.1057958	0.4016
Cantidad	Porcentaje de desgaste alar	65	0.02459521	0.8458
Cantidad	Anchura máxima de la cabeza	65	-0.1075281	0.3939
Complejidad	Desgaste tradicional (Rebêlo & Garófalo, 1991)	65	0.3749991	0.002085
Complejidad	Porcentaje de desgaste alar	65	0.3198002	0.009408
Complejidad	Anchura máxima de la cabeza	65	0.0439093	0.7284

Redes de interacciones individuo x recurso aromático para cada fito-fisionomía

En general, las redes de interacción presentaron baja conectividad, baja modularidad y bajo grado de especialización individual (Tabla 3; Figura 7A-B), por lo tanto, no se evidencia variación en el uso del recurso aromático por parte de los individuos de *El. nigrita*. Sin embargo, el anidamiento registró valores intermedios significativos superior al 50% en ambas fito-fisionomías, lo que sugiere diferencias en el nivel de especialización de los individuos. El tamaño de efecto (SES) fue similar en las redes de ambos ambientes, indicando un patrón de anidamiento semejante entre sí.

Tabla 3. Valores de los parámetros las redes de interacción individuo-recurso aromático para *Eulaema nigrita* en cada tipo de ambiente. Nota: FES: Bosque Semidecidual Estacional; CER: Cerrado *sensu stricto*; C: conectividad; N: anidamiento; H_2' : grado de especialización; M: modularidad.

	CER			FES		
	Observado	CI 95%	SES	Observado	CI 95%	SES
C	0.3136			0.3239		
N	0.5628	0.1460-0.1508	10.6501	0.5118	0.0888-0.0938	10.4663
H_2'	0.2327	0.9967-0.9969	2227.99	0.2375	0.9983-0.9984	2319.573
M	0.2025	0.0017-0.0018	310.2348	0.2166	0.0180-0.0181	348.6596

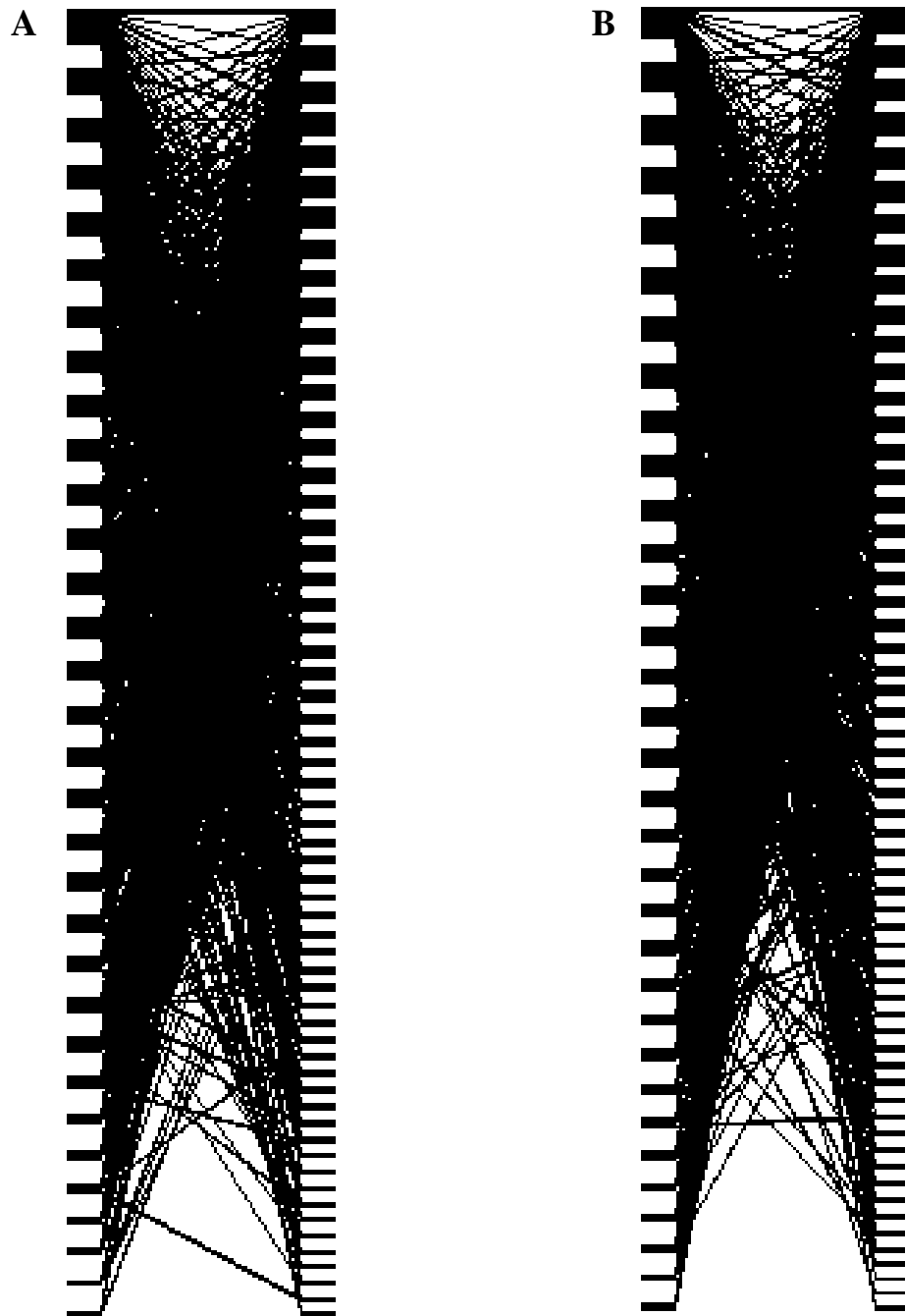


Figura 7. Redes de interacciones bipartitas de machos de *Eulaema. nigrita* provenientes de Bosque Semideciduo Estacional (A) y de Cerrado *sensu stricto* (B). Las líneas representan la interacción entre los individuos (recuadro izquierdo) y los compuestos químicos (recuadro derecho).

Discusión

Como contribución de este estudio al conocimiento sobre la química del perfume de machos euglosinos, se destaca (i) la gran cantidad de componentes del perfume de machos de *El. nigrita*; (ii) la similaridad química en el perfume de individuos colectados en ambas fito-fisionomías muestreadas; (iii) el patrón anidado de las redes de interacciones individuo-recurso aromático en los dos tipos de ambiente; y (iv) la relación positiva entre la complejidad del “bouquet” y medidas del desgaste alar de los machos. Este conocimiento puede ser tomado como un punto de inicio en el estudio del perfume de comunidades de euglosinos en distintos ecosistemas brasileños.

Composición del perfume de Eulaema nigrita

La mayoría de los compuestos exógenos identificados en el perfume de *El. nigrita* pertenecen a diversas clases de terpenos y compuestos aromáticos encontrados en las fragancias de machos de *Eulaema cingulata* Fabricius (Whitten *et al* 1989) y varias especies del género *Euglossa* (Eltz *et al* 2005; Zimmermann *et al* 2009; Pokorny *et al* 2013). Por ejemplo, el escatol es un compuesto aromático asociado a la madera en descomposición que ha demostrado ser atractivo para machos de *Eulaema cingulata* y *Euglossa purpurea* Friese en bosques de América Central (Whitten *et al* 1989; Whitten *et al* 1993) y se ha encontrado en el perfume de varias otras especies de *Euglossa* (Zimmermann *et al* 2009). En este estudio, el escatol fue bastante frecuente en el perfume de individuos de FG y REP, mientras que, de los 33 machos colectados en ambientes de sabana, sólo cuatro registraron el compuesto. Exceptuando algunas especies vegetales de Araceae como fuentes florales de escatol (Smith & Meeuse, 1966), no existe evidencia que sugiera una abundante oferta de dicho compuesto aromático a partir de fuentes florales (Gerlach & Schill, 1991; Kaiser, 1993).

Por lo tanto, a menos que existan fuentes florales desconocidas, es posible que el escatol colectado por machos euglosinos provenga principalmente de fuentes vegetales no florales, por ejemplo, madera en descomposición, corteza de troncos con heridas infectadas por hongos y heces fecales (Whitten *et al* 1993). Esto explicaría la mayor presencia de escatol

en el perfume de individuos provenientes de fito-fisionomías boscosas, ya que este tipo de fuentes se tornarían más abundantes debido a la mayor humedad que tales ambientes conservan cuando son comparados con las fito-fisionomías de sabanas. Del mismo modo, se encontraron otros compuestos de potencial origen no floral, como el Indol, Carvona y Dihydrocarvona anteriormente encontrados en el perfume de *El. cingulata* (Whitten *et al* 1989). Estos compuestos también pueden ser obtenidos de flores, habiendo preferencia de los machos por coleccionar a partir de tales fuentes (Williams, 1982). Sin embargo, coleccionar algunos de estos compuestos a partir de fuentes no florales más abundantes y duraderas como la madera en descomposición podría ser de mayor provecho para el “bouquet” de los machos (Whitten *et al* 1993), un fenómeno plausible en poblaciones de *El. nigrita* del Cerrado.

Otro compuesto a destacar es la presencia del óxido de trans-carvona en el perfume de *El. nigrita* de las seis áreas muestreadas; es un epóxido de monoterpeno atractivo para machos de diferentes especies de *Eulaema* (Whitten *et al* 1986; Whitten *et al* 1989; Brandt *et al* 2019; El-Sayed, 2020). Además de ser el compuesto mayoritario de la fragancia floral de al menos diez especies de Orchidaceae, también ha sido aislado de las flores de especie *Dalechampia spathulata* (Euphorbiaceae) (Whitten *et al* 1986). Asumiendo que la presencia del óxido de trans-carvona en plantas que no están íntimamente relacionadas o que son taxonómicamente distantes son un producto de la convergencia evolutiva en recompensas químicas (Whitten *et al* 1986; Brandt *et al* 2019), no sería inverosímil pensar que este fenómeno se presente entre especies de Euphorbiaceae distribuidas en áreas del Cerrado como las aquí muestreadas.

Efecto del ambiente sobre el perfume de Eulaema nigrita

El perfume de individuos de *El. nigrita* pertenecientes a ambientes boscosos fue químicamente similar al de aquellos coleccionados en ambientes de sabana. Al menos dos hipótesis no excluyentes podrían explicar tal resultado. Una de ellas sería que las diferencias florísticas entre fito-fisionomías boscosas y de sabana no se ven reflejadas en la disponibilidad de fuentes aromáticas usadas por los machos. Pokorny *et al* (2013) analizaron el perfil químico de poblaciones de *Euglossa dilemma* en ecosistemas de bosque costero y bosque de interior en la península de Yucatán-México, encontrando similitud química en

el perfume de poblaciones de diferentes ambientes. Sin embargo, mediante el mismo análisis, los autores destacan diferencias en el perfume entre poblaciones costeras y de interior en la especie *Euglossa viridissima* debido a la alta proporción del compuesto L97 (“fatty acid lactone derivative of linolenic acid”) en el “bouquet” de poblaciones costeras ocasionado por su supuesta alta disponibilidad. Por el contrario, en este estudio no se evidencia dominancia de algún compuesto en individuos de *El. nigrita* de algún ambiente en particular, lo que apoya la idea de una oferta de olores similar en distintos ambientes del Cerrado.

Otra posible causa de la similitud del perfume de individuos de ambos ambientes sería la alta capacidad de vuelo que se les atribuye (Janzen, 1971; Kroodsma, 1975; Ackerman *et al* 1982) asociada a la plasticidad de forrajeo de *El. nigrita* con relación al uso de recursos. Considerando dichas características junto a la presencia de otros tipos de fito fisionomía dentro del paisaje del Cerrado (Figura 1B) es posible que los machos puedan explotar otros recursos en sitios circundante al área de estudio. Aunque existe controversia sobre el tamaño de las áreas cubiertas por machos euglosinos durante la actividad de colecta (Zimmermann *et al* 2009), el amplio rango de vuelo de los individuos posibilita que puedan acceder a una amplia gama de recursos dentro del paisaje diverso del Cerrado. Por lo tanto, es factible que la similaridad química en el perfume de individuos de distintas áreas estén íntimamente relacionada con la capacidad de dispersión de los machos.

A pesar de la semejanza del perfume entre machos de bosque y de sabana, hubo una diferencia significativa en la composición del perfume de individuos de REP y FIR. Este resultado sugiere que, al no existir un efecto de la fito-fisionomía sobre la composición del perfume (al menos a nivel cualitativo), podría haber un efecto de la estructura del paisaje sobre el uso de las fuentes aromáticas. Es decir, la heterogeneidad contrastante del entorno circundante a las áreas de REP y FIR (Figura 1B) podría estar influyendo gradualmente la obtención de recursos aromáticos o las preferencias innatas de los machos de *El. nigrita*. Aunque los fragmentos boscosos de REP y FIR son florísticamente semejantes (al menos desde el estrato arbóreo) y de tamaño similar (Lopes *et al* 2012), existe una aparente baja conexión entre ellos (considerando la cobertura vegetal del paisaje, Figura 1B) que estaría generando un aislamiento incipiente entre individuos de ambos sitios, indicadas por las diferencias en el perfume.

Relación entre el perfume y rasgos morfológicos asociados al “fitness”

Los resultados de las correlaciones encontradas entre fenotipos de la fragancia de euglosinos y la anchura máxima de la cabeza (indicador del tamaño corporal) resultaron ser débiles y no significativas. Este resultado está basado en una muestra relativamente grande de individuos de *El. nigrita*. La falta de correlación positiva entre cantidad/complejidad del perfume y parámetros medibles asociados al tamaño coincide con los resultados negativos hallados en poblaciones de *Eg. viridissima* y *Eg. dilemma* en México (Eltz *et al* 2015) y con resultados similares encontrados en *Euglossa tridentata* en bosques húmedos de Panamá (Eltz, 1997).

De acuerdo con comentarios personales publicados por Eltz *et al* (2005), no existe indicios de que el tamaño corpóreo sea un rasgo importante de selección sexual en machos euglosinos. Individuos de grande talla no parecen tener ventajas sobre individuos de menor tamaño a la hora de colectar el recurso volátil. Eltz *et al* (2015) han observado especies de euglosinos de diferente porte forrajeando juntos en una misma trampa aromática de manera sincrónica y sin tendencias a monopolizar tal fuente. Esto podría estar ocurriendo en las poblaciones de *El. nigrita* estudiadas, donde se colectaron individuos de tamaños variados, muchos de ellos pequeños en comparación a los tamaños referenciados en las hembras.

El desgaste alar fue el parámetro del fitness asociado a por lo menos uno de los rasgos fenotípicos del perfume (complejidad) de *El. nigrita*. Esto coincide con lo encontrado por Eltz *et al* (2015) en individuos de *Eg. dilemma* y *Eg. viridissima* en México, donde también se observaron valores de correlación positiva pero débiles. No encontrar fuerte asociación entre rasgos fenotípicos del perfume y el desgaste alar puede ser consecuencia de la baja exactitud de este último como medida predictora de la edad o de las características individuales de los machos que influyen en la velocidad de adquisición del perfume (Eltz *et al* 1999). Por ejemplo, machos euglosinos con una tasa de desgaste alar acelerada pueden mostrar baja capacidad de forrajeo de compuestos (Eltz *et al* 2015), afectando la precisión de las medidas de desgaste alar como indicadores de edad. Otro caso sería el de individuos más viejos que han perdido parte de su carga aromática (Eltz *et al* 2015), aunque esto iría en

contraposición de la hipótesis de acumulación de fragancias a largo plazo (Eltz *et al* 1999), a excepción de que el perfume sea verdaderamente gastado en actividades reproductivas.

Por otro lado, la falta de correlación entre la cantidad del perfume y el desgaste alar en machos de *El. nigrita* contrasta con lo registrado para *Euglossa cognata* en Panamá (Eltz *et al* 1999) y *Eg. viridissima* en México (Eltz *et al* 2015). Es de esperar que se encuentre una correlación positiva entre cantidad del perfume y desgaste alar, considerando que la masa poblacional de machos euglosinos colectados en diferentes levantamientos faunísticos son conformados mayormente por individuos jóvenes (Eltz *et al* 1999; Pokorny *et al* 2013; Eltz *et al* 2015), incluyendo comunidades de formaciones boscosas del Cerrado (Tosta *et al* 2017). El resultado distinto de este estudio podría haber sido ocasionado por las limitaciones en la detección de pequeños picos cromatográficos y/o en la estimación de proporciones durante el análisis GC-MS, por el método cromatográfico empleado o por las diferencias entre los procesos de extracción del perfume.

De cualquier modo, la relación entre “blends” aromáticos y la edad como reflejo de la capacidad de sobrevivencia continúa siendo demostrada en abejas de las orquídeas (Eltz *et al* 1999) y congruente con la teoría subyacente a elección femenina de individuos machos con alta calidad genética (Zahavi *et al* 1975; Brooks & Kemp 2001). Por supuesto, el aumento del éxito reproductivo en los machos y la reducción del riesgo de apareamientos híbridos genéticamente inferiores en la selección de las hembras son los mayores beneficios al “fitness”. No obstante, el “fitness” de un individuo rara vez depende sólo del éxito reproductivo. De hecho, los beneficios asociados a otros componentes del “fitness” igualmente importantes como la viabilidad/sobrevivencia a menudo resultan perjudicados (o inalterados) en beneficio del éxito de apareamiento (Brooks & Kemp 2001). Por ejemplo, experimentos de copula demostraron que las hembras del insecto hematófago *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva prefirieron aparearse con machos de edad intermedia por encima de machos jóvenes o viejos (Jones *et al* 2000), sin ninguna afectación en el éxito reproductivo de la hembra, a excepción de una disminución en la tasa de eclosión de huevos engendrados por machos más viejos. Es posible que la acumulación de un elaborado perfume en machos euglosinos imponga costos a la sobrevivencia, pero sin comprometer el fenotipo de fragancia óptimo de la especie preferido por las hembras.

Redes anidadas en Eulaema nigríta

Las métricas calculadas para las redes individuo-recurso químico indican que los machos de *El. nigríta* utilizaron una gama de compuestos similar entre todas las poblaciones, tendiendo a un hábito generalista. Las redes mostraron anidamiento significativo superior al 50% en ambas fito-fisionomías. Interpretando de forma análoga a las redes alimenticias, dichos valores sugieren que las poblaciones están compuestas tanto de individuos generalista como de individuos selectivos. De acuerdo con Pires *et al* (2011) los patrones anidados resultan ser bastante comunes en análisis de redes tróficas, con individuos mostrando preferencias similares por sus recursos principales, pero diferenciándose en su disposición para coleccionar recursos alternativos en escenarios de escases. Análogamente, este patrón podría estar ocurriendo con los machos de *El. nigríta* y sus recursos químicos debido a distintas respuestas fenotípicas de los individuos (Bolnick *et al* 2003; Bolnick *et al* 2007) frente a las presiones ambientales de cada fito-fisionomía.

Por ejemplo, diferencias en la edad de individuos de *El. nigríta* podrían ser un reflejo del patrón anidado de estas redes, con machos jóvenes (“selectivos”) interactuando únicamente con un subconjunto propio de los recursos mayormente asociados a los individuos más viejos (“generalistas”). Variaciones en la capacidad comportamental de los individuos de buscar o manipular determinados recursos pueden influir diferencialmente en la eficiencia de forrajeo de los mismos, generando variación intra-poblacional en el uso del recurso (Bolnick *et al* 2003), aunque no necesariamente desencadenando en nichos químicos distintos.

Por otro lado, el patrón de las redes aquí generadas parece no ser altamente anidado como en aquellos mostrados en publicaciones de redes tróficas (Araújo *et al* 2010; Pires *et al* 2011). De acuerdo con Bascompte *et al* (2003), el anidamiento incrementa junto al número de interacciones de una red la cual es una medida de la complejidad de esta. De hecho, dichos autores demostraron que el anidamiento de 14 redes bipartitas es significativamente menor al del conjunto de redes tróficas (con un número de especies e interacciones mayor) del que fueron extraídas. Por consiguiente, es plausible que, incluir más tipos de recursos (tipo de

compuestos) en los análisis de redes de *El. nigrita* generaría cierta variación en los valores de anidamiento obtenidos.

Etapas futuras

De manera general, este estudio presentó informaciones pioneras sobre el perfil químico del perfume de una especie de euglosino, *El. nigrita* presentes en áreas del bioma brasileño Cerrado. De hecho, éste estudio sería el primer abordaje sobre la química del perfume de machos euglosinos en ecosistemas brasileños y sudamericanos, pues actualmente no se tiene registro sobre otros estudios de esta índole para estas latitudes.

A través del método de extracción empleado, se pudo identificar un mínimo de 61 compuestos exógenos formadores del perfume de machos de *El. nigrita*, un número relativamente semejante a lo observado en trabajos publicados (Eltz *et al* 1999; Eltz *et al* 2005; Zimmermann *et al* 2009). Aun así, para tener mayor certeza sobre la conformación química de dicho perfume, otros estudios deberán implementar métodos de extracción del perfume distintos al utilizado aquí y/o comparables a aquellos usados en la mayoría de las publicaciones, por ejemplo, la extracción del perfume en solución de hexano o el método de micro-extracción en fase sólida (“SPME”). Estos métodos serían capaces de extraer un perfil químico potencialmente más completo, capturando compuestos orgánicos semivolátiles más complejos que podrían hacer parte del perfume y hasta tener algún papel funcional en el “display” sexual de los machos. De cualquier modo, se tendría una idea más precisa sobre la variabilidad intraespecífica del perfume en machos de *El. nigrita*.

Con respecto a la similaridad química observada en el perfume de poblaciones del Cerrado, para corroborar ese resultado será necesario analizar el perfume de individuos colectados en el periodo seco-frío, contrastándolo con las informaciones del periodo húmedo-cálido mostradas aquí. Adicionalmente, futuras investigaciones deberían analizar poblaciones de *El. nigrita* presentes en otros biomas brasileños, principalmente en “Mata Atlântica” y selva Amazónica, conocidos por alojar una mayor abundancia de estas abejas (Dressler, 1982; Nemésio & Silveira, 2007; Ramírez *et al* 2010). Encontrar similaridad o variación estacional y geográfica en la química del perfume reafirmaría el concepto de especie-especificidad del perfume (Eltz *et al* 2005) para comunidades insertas en ecosistemas

brasileños, además de permitir nuevas comparaciones con los resultados mostrados en este estudio.

Referente a la correlación positiva entre el perfume de *El. nigrita* y el desgaste alar como medida de la edad, futuros estudios podrían continuar indagando sobre posibles factores que estén influyendo en la fuerza de dicha relación. Como ya fue mencionado por Eltz *et al* (2015), trabajos posteriores tendrán como desafío encontrar un parámetro indicador de la edad más preciso que las medidas de desgaste alar a ser correlacionado con rasgos fenotípicos del perfume de euglosinos.

Referencias Citadas

- Ackerman, J.D. 1989. Geographic and Seasonal Variation in Fragrance Choices and Preferences of Male Euglossine Bees. *Biotropica* 21 (4): 340–347. <https://doi.org/10.2307/2388284>
- Ackerman J.D., Mesler, M.R., Lu, K.L. & Montalvo, A.M. 1982. Food-foraging behavior of male Euglossini (Hymenoptera: Apidae): vagabonds or trapliners? *Biotropica* 14: 241-248.
- Adams, R.P. 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, ed. 4.1., Allured publishing.
- Aguiar, W.M. & Gaglianone, M.C. 2012. Euglossine bee communities in small forest fragments of the Atlantic Forest, Rio de Janeiro state, southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 56 (2): 210–219. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262012005000018>
- Aguiar, W.M., Melo, G.A.R. & Gaglianone, M.C. 2014. Does Forest physiognomy affect the structure of orchid bee (Hymenoptera, Apidae, Euglossini) communities? A study in the Atlantic forest of Rio de Janeiro state, Brazil. *Sociobiology* 61 (1): 68–77. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i1.68-77>
- Alcock, J. 1996. The relation between male body size, fighting, and mating success in Dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni* (Apidae, Apinae, Anthophorini). *Journal of Zoology* 239: 663–674.
- Alvarenga, P.E.F., Freitas, R.F. & Augusto, S.C. 2007. Diversidade de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em áreas de cerrado do Triângulo Mineiro, MG. *Bioscience Journal* 23: 30–37.
- Araújo, M.S., Guimarães, P.R., Svanbäck, R., Pinheiro, A., Guimarães, P., Reis, S.F.Dos. & Bolnick, D.I. 2008. Network Analysis Reveals Contrasting Effects of Intraspecific Competition on Individual Vs Population Diets. *Ecology* 89 (7): 1981-1993. <https://doi.org/10.1890/07-0630.1>

- Araújo, M.S., Martins, E.G., Cruz, L.D., Fernandes, F.R., Linhares, A.X., Reis, S.F.Dos. & Guimarães, P.R. 2009. Nested diets: A novel pattern of individual-level resource use. *Oikos* 119 (1): 81-88. <https://doi.org/10.1111/j.16000706.2009.17624.x>
- Araújo, M.S., Martins, E.G., Cruz, L.D., Fernandes, F.R., Linhares, A.X., dos Reis, S.F. & Guimaraes, P.R. Jr. 2010. Nested diets: a novel pattern of individual-level resource use. *Oikos* 119: 81–88.
- Araújo, M.S., Bolnick, D.I. & Layman, C.A. 2011. The ecological causes of individual specialisation. *Ecology Letters* 14 (9): 948-958. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01662.x>
- Bascompte, J., Jordano, P., Melián, C.J. & Olesen, J.M. 2003. The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 9383–9387.
- Blüthgen, N., Menzel, F. & Blüthgen, N. 2006. Measuring specialization in species interaction networks. *BMC Ecology* 6 (1): p 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-9>
- Bolnick, D.I., Svanbäck, R., Fordyce, J.A., Yang, L.H., Davis, J.M., Hulsey, C.D. & Forister, M.L. 2003. The Ecology of Individuals: Incidence and Implications of Individual Specialization. *The American Naturalist* 161 (1): p 128. <https://doi.org/10.1086/343878>
- Bolnick, D.I., Svanbäck, R., Araújo, M.S. & Persson, L. 2007. Comparative support for the niche variation hypothesis that more generalized populations also are more heterogeneous. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 10075–10079.
- Boughman, J.W. 2002. How sensory drive can promote speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, 17 (12), 571–576. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02595-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02595-8)
- Brand, P., Hinojosa-Díaz, I.A., Ayala, R., Daigle, M., Yurrita-Obiols, C.L., Eltz, T. & Ramírez, S.R. 2020. The evolution of sexual signaling is linked to odorant receptor tuning in perfume-collecting orchid bees. *Nature Communications*, 244, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14162-6>
- Brandt, K., Dötterl, S., Fuchs, R., Navarro, D.M.D.A.F., Machado, I.C.S., Dobler, D., Reiser, O., Ayasse, M. & Milet-Pinheiro, P. 2019. Subtle Chemical Variations with Strong Ecological Significance: Stereoselective Responses of Male Orchid Bees to Stereoisomers of Carvone Epoxide. *Journal of chemical ecology*, **45**(5), 464-473.
- Brooks, R. & Kemp, D.J. 2001. Can older males deliver the good genes? *TREE* 16: 308–313.
- Cardoso, E. & Schiavini, I. 2002. Relação entre distribuição de espécies arbóreas e topografia em um gradiente florestal na Estação Ecológica do Panga (Uberlândia, MG). *Revista Brasileira de Botânica* 25 (3): 277–289.
- Cardoso-Da Silva, J.M. & Bates, J.M. 2002. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot The Cerrado, which includes both forest and savanna habitats, is the second largest South American biome, and among the most

threatened on the continent. *Bioscience* 52,: 225–234. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0225:bpacit\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0225:bpacit]2.0.co;2)

- Clarke, K.R. & Green, R.H. 1988. Statistical design and analysis for a “biological effects” study. *Marine Ecology Progress Series* 46: 213–226.
- Clarke, K.R. Warwick, R.M. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edn. PRIMER-E Ltd, Plymouth.
- Costa, C.P., Machado, C.A.S., Santiago, W.M.S., Dallacqua, R.P., Garófalo, C.A., Francoy, T.M. 2020. Biome variation, not distance between populations, explains morphological variability in the orchid bee *Eulaema nigrita* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie* 51: 984–996. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00776-z>
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Dormann, C.F., Gruber, B. & Frund, J. 2008. Introducing the bipartite Package: Analysing Ecological Networks. *R News* 8 (2): 8-11.
- Dormann, C.F., Frund, J., Bluthgen, N. & Gruber, B. 2009. Indices, Graphs and Null Models: Analyzing Bipartite Ecological Networks. *The Open Ecology Journal* 2 (1): 7-24. <https://doi.org/10.2174/1874213000902010007>
- Dormann, C.F. 2011. How to be a specialist? Quantifying specialisation in pollination networks. *Network Biology* 1 (1): 1-20.
- Dressler, R.L. 1982. Biology of the Orchid bees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 13, 373–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.13.110182.002105>
- El-Sayed, A.M. 2020. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. In: The Pherobase. <http://www.pherobase.com>. Accessed 4 March 2021.
- Eltz, T., Whitten, W.M., Roubik, D.W. & Linsenmair, K. E. 1999. Fragrance collection, storage, and Accumulation by individual male Orchid bees. *Journal of Chemical Ecology*, 25 (1): 157-176.
- Eltz, T., Roubik, D.W. & Lunau, K. 2005. Experience-dependent choices ensure species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. *Behavior Ecology Sociobiology* 59: 149–156. [doi:10.1007/s00265-005-0021-z](https://doi.org/10.1007/s00265-005-0021-z)
- Eltz, T., Ayasse, M. & Lunau, K. 2006. Species-specific antennal responses to tibial fragrances by male orchid bees. *Journal of Chemical Ecology*. 32: 71–79.
- Eltz, T., Zimmermann, Y., Haftmann, J., Twele, R., Francke, W., Quezada-Euan, J. J. G. & Lunau, K. 2007. Enflourage, lipid recycling, and the origin of perfume collection in orchid bees. *Proceedings of the Royal Society B* 274: 2843–2848.
- Eltz, T., Zimmermann, Y., Pfeiffer, C., Ramirez-Pech, J., Twele, R., Francke, W., Quezada-Euan, J.J.G. & Lunau, K. 2008. An olfactory shift is associated with male perfume differentiation and species divergence in orchid bees. *Current Biology* 18: 1844–1848.

- Eltz, T., Bause, C., Hund, K., Quezada-Euan, J.J.G. & Pokorny, T. 2015. Correlates of perfume load in male orchid bees. *Chemoecology* 25: 193–199. doi 10.1007/s00049-015-0190-9
- Gerlach, G. & Schill, R. 1991. Composition of orchid scents attracting euglossine bees. *Botanica Acta* 104 (5): 379-384.
- Giangarelli, D.C., Aguiar, W.M. & Sofia, S.H. 2015. Orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) assemblages from three different threatened phytophysiognomies of the subtropical Brazilian Atlantic Forest. *Apidologie*: 46 (1): 71–83. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0303-4>
- Harary, F. 1969. Graph Theory. Addison-Wesley Publishing Company, Menlo Park, Massachusetts, USA.
- Heinrich, B. 1976. Resource Partitioning Among Some Eusocial Insects: Bumblebees. *Ecology* 57 (5): 874-889. <https://doi.org/10.2307/1941054>
- Jackson, D.E. 2008. Sympatric Speciation: Perfume Preferences of Orchid Bee Lineages. *Current Biology* 18 (23): 1092–1093. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.023>
- Janzen, D.H. 1971. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* 171: 203-205.
- Jones, T.M., Balmford, A. & Quinnell, R.J. 2000. Adaptive female choice for middle-aged mates in a lekking sandfly. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267 (1444): 681–686.
- Kaiser, R. 1993. The Scent of Orchids: Olfactory and Chemical Investigations. Elsevier, Amsterdam. 259 pp.
- Kim, J.Y. & Thorp, R.W. 2001. Maternal investment and size-number trade-off in a bee, *Megachile apicalis*, in seasonal environments. *Oecologia* 126: 451–456.
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B. & Rubel, F. 2006. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* 15 (3): 259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>
- Kroodsma D.E. 1975. Flight distances of male euglossine bees in orchid pollination. *Biotropica* 7: 71-72.
- Legendre P, Legendre L (1998) Numerical ecology, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam.
- Lopes, S.F., Schiavini, I., Prado-Júnior, J.A., Gusson, A.E. & Souza Neto, A.R. 2011. Caracterização ecológica e distribuição diamétrica da vegetação arbórea em um remanescente de Floresta Estacional Semidecidual, na Fazenda experimental do Glória, Uberlândia, MG. *Bioscience Journal* 27 (2): 322–335.
- Lopes, S.F., Schiavini, I., Oliveira, A.P. & Vale, V.S. 2012. An Ecological Comparison of Floristic Composition in Seasonal Semideciduous Forest in Southeast Brazil: Implications for Conservation. *Inter. Journal of Forestry Research*. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/537269>

- Lopes-de Faria, S., Júnior-do Prado, J.A., Vale, V.S. & Schiavini, I. 2013. Impactos ambientais antrópicos como modificadores da estrutura e funcionalidade de florestas estacionais semidecíduais no Triângulo Mineiro, Brasil. *Caminhos de geografia* 14 (47): 233–242.
- Milet-Pinheiro, P. & Schlindwein, C. 2008. Community of bees (Hymenoptera, Apoidea) and plants in an area of Agreste in Pernambuco, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 52 (4): 625–636. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262008000400014>
- Mitko, L., Weber, M.G., Ramirez, S.R., Hedenström, E., Wcislo, W.T. & Eltz, T. 2016. Olfactory specialization for perfume collection in male orchid bees. *J. Exp. Biol.* 219, 1467–1475.
- Moure, J.S., Melo, G.A.R. & Faria Jr, L.R.R. 2012. Euglossini Latreille, 1802. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Feb/07/2020
- Mueller, U.G. & Wolf-Mueller, B. 1993. A Method for Estimating the Age of Bees: Age Dependent Wing Wear and Coloration in the Wool Carder Bee *Anthidium manicatum* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Insect Behavior.*, 6 (4): 529–537. <https://doi.org/10.1007/BF01049530>
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403 (6772): 853-858. www.nature.com 403
- Nemésio, A. & Silveira, F. 2007. Diversity and Distribution of Orchid Bees (Hymenoptera: Apidae) with a Revised Checklist of Species. *Neotropical Entomology* 36 (6): 874–888. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2007000600008>
- NIST - Mass Spectral Library with Search Program v20, Standard Version 2.4.
- Oksanen, J. Vegan: ecological diversity. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://cran.auckland.ac.nz/web/packages/vegan/vignettes/diversity-vegan.pdf>.
- Ospina-Torres, R., Montoya-Pfeiffer, P.M., Parra-H, A., Solarte, V. & Otero, J.T. 2015. Interaction networks and the use of floral resources by male orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) in a primary rain forests of the Chocó Region (Colombia). *Revista de Biología Tropical* 63 (3): 647–658.
- Pacheco, A.S. 2018. *Eulaema nigrita* Lepelletier 1841 em remanescentes florestais do Cerrado: parâmetros populacionais e a influência da cor na coleta de fragrâncias aromáticas. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. UFU. Uberlândia-MG. 66p.
- Peruquetti, R.C. 2003. Variação do tamanho corporal de machos de *Eulaema nigrita* Lepelletier (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). Resposta materna à flutuação de recursos? *Revista Brasileira de Zoologia* 2: 207-212.

- Peruquetti R.C., Campos L.A.O., Coelho C.D.P., Abrantes C.V.M. & Lisboa L.C.O. 1999. Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 101–118.
- Pires, M.M., Guimarães, P.R., Araújo, M.S., Giaretta, A.A., Costa, J.C.L. & Reis, S.F.Dos. 2011. The nested assembly of individual-resource networks. *Journal of Animal Ecology* 80: 896–903. <https://doi.org/10.1111/j.13652656.2011.01818.x>
- Pokorny, T., Hannibal, M., Quezada-Euan, J.J.G., Hedenström, E., Sjöberg, N., Bang, J. & Eltz, T. 2013. Acquisition of species-specific perfume blends: influence of habitat-dependent compound availability on odour choices of male orchid bees (*Euglossa* spp.). *Oecologia* 172: 417–425.
- Ramírez S., Dressler, R.L. & Ospina, M. 2002. Abejas euglosinas (Hymenoptera: Apidae) de la región neotropical: listado de especies con notas sobre su biología. *Biota Colombiana* 3: 7–118.
- Ramírez, S., Roubik, D.W., Skov, C. & Pierce, N.E. 2010. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees (Hymenoptera: Apidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 552–572. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01440.x>
- Rebêlo, J.M.M. & Garófalo, CA. 1991. Diversidade e Sazonalidade de machos de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) e preferências por iscas odores em um fragmento de floresta no Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 51: 787–799.
- Ribeiro, J.F & Walter, B.M.T. 2008. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. En: Sano, S.M., de Almeida, S.P. & Ribeiro, J.F. Cerrado: ecologia e flora (pp.151-212). *Embrapa Cerrados/Embrapa Informação Tecnológica*.
- Roulston, T.H. & Cane J.H. 2000. The effect of diet breadth and nesting ecology on body size variation in bees (Apiformes). *Journal of the Kansas Entomological Society* 73: 129–142.
- Sano, E.E., Rosa, R., Brito, J.L.S., Ferreira, L.G. & Bezerra, H.S. 2009. Mapeamento da cobertura vegetal natural e antrópica do bioma Cerrado por meio de imagens Landsat ETM+. In: Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. INPE, Natal, pp. 1199-1206
- Silveira, G.C., Nascimento, A.M., Sofia, S.H. & Augusto, S.C. 2011. Diversity of the euglossine bee community (Hymenoptera, Apidae) of an Atlantic Forest remnant in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 55 (1): 109–115. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262011000100017>
- Silveira, G.C., Freitas, R.F., Tosta, T.H.A., Rabelo, L.S., Gaglianone, M.C., & Augusto, S.C. 2015. The orchid bee fauna in the Brazilian savanna: do forest formations contribute to higher species diversity? *Apidologie* 46 (2): 197–208. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0314-1>
- Smadja, C. & Butlin, R.K. 2009. On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity* 102: 77–97.

- Smith, B.N. & Meeuse, B.J.D. 1966. Production of volatile amines and skatole at anthesis in some Arum lily species. *Plant Physiology* 41:343-347.
- Stern, D.L. 1991. Male Territoriality and alternative male-behaviors in the Euglossine Bee, *Eulaema meriana* (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 64, (4): 421-437.
- Stone, G.N., Loder, P.M.J. & Blackburn, T.M. 1995. Foraging and courtship behavior in males of the solitary bee *Anthophora plumipes* (Hymenoptera, Anthophoridae): thermal physiology and the roles of body-size. *Ecological Entomology* 20 (2): 169–183.
- Strohm, E. 2000. Factors affecting body size and fat content in a digger wasp. *Oecologia* 123: 184–191.
- TEAM, R.C.R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013, 2018.
- Tepedino, V.J., Thompson, R. & Torchio, P.F. 1984. Heritability for size in the Megachilid bee *Osmia lignaria propinqua* Cresson. *Apidologie* 15: 83–87.
- Tinker, M.T., Guimarães, P.R., Novak, M., Marquitti, F.M.D., Bodkin, J.L., Staedler, M., Bentall, G. & Estes, J.A. 2012. Structure and mechanism of diet specialisation: Testing models of individual variation in resource use with sea otters. *Ecology Letters* 15 (5): 475-483. <https://doi.org/10.1111/j.14610248.2012.01760.x>
- Tonhasca, A., Blackmer, J.L. & Albuquerque, G.S. 2002. Abundance and diversity of euglossine bees in the fragmented landscape of the Brazilian Atlantic forest. *Biotropica* 34: 416–422.
- Tosta, T.H.A., Silveira, G.C., Schiavini, I., Sofia, S.H. & Augusto, S.C. 2017. Using short-term surveys and mark–recapture to estimate diversity and population size of orchid bees in forest formations of the Brazilian savanna. *Journal of Natural History* 51 (7-8): 391–403. <https://doi.org/10.1080/00222933.2016.1274441>
- Villalobos, E.M. & Shelly, T.E. 1991. Correlates of male mating success in two species of *Anthidium* bees (Hymenoptera: Megachilidae). *Behavior Ecology Sociobiology* 29: 47–53.
- Weber, M. G., Mitko, L., Eltz, T. & Ramírez, S.R. 2016. Macroevolution of perfume signalling in orchid bees. *Ecology Letters* 19: 1314–1323.
- Whitten, W.M., Williams, N.H., Armbruster, W.S., Battiste, M.A., Streckowski, L. & Lindquist, N. 1986. Carvone oxide: an example of convergent evolution in euglossine pollinated plants. *Systematic Botany*: 222-228.
- Whitten, W.M., Young A.M. & Williams, N.H. 1989. Function of glandular secretions in fragrance collection by male euglossine bees (Apidae: Euglossini). *Journal of Chemical Ecology* 15: 1285-1295.
- Whitten, W.M., Young, A.M. & Stern, D.L. 1993. Nonfloral sources of chemicals that attract male euglossine bees (Apidae: Euglossini). *Journal of Chemical Ecology* 19: 3017–3027.

- Williams, N.H. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. pp. 119-171 in: J. Arditti (ed.). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives, II*. Cornell Univ. Press. Ithaca, New York.
- Wyatt, T.D. 2003. *Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste*. Cambridge Univ. Press, EE.UU. 391 p.
- Zaccarelli, N., Bolnick, D.I. & Mancinelli, G. 2013. RInSp: An r package for the analysis of individual specialization in resource use. *Methods in Ecology and Evolution* 4 (11): 1018-1023. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12079>
- Zahavi, A. 1975. Mate selection - a selection for a handicap. *Journal of theoretical Biology* 53 (1): 205-214.
- Zimmermann, Y., Ramírez, S.R. & Eltz, T. 2009. Chemical niche differentiation among sympatric species of orchid bees. *Ecology* 90: 2994–3008.