

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)

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 semidecídúo 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 nigrita* 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 nigrita* 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. nigrita* com o alvo de avaliar diferenças no perfil químico do perfume em populações de *El. nigrita* 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. nigrita*, 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.

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 el de 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.

CONCLUSIÓN

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 métodos 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 solida (“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 sistema de comunicación químicas 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 similitud 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.
- 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.

- 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>
- 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)
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- 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>
- 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
- 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. Enfleurage, 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
- 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>
- 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.
- 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>
- 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>
- 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.
- 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.
- 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*.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- Wyatt, T.D. 2003. Pheromones and Animal Behaviour: Communication by Smell and Taste. Cambridge Univ. Press, EE.UU. 391 p.
- Zimmermann, Y., Ramírez, S.R. & Eltz, T. 2009. Chemical niche differentiation among sympatric species of orchid bees. *Ecology* 90: 2994–3008.