



**LUIZ ROBERTO DE OLIVEIRA**

**USO DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA COMO  
FERRAMENTA NO TESTE DE DIFERENÇAS ENTRE AS  
CASTAS SOCIAIS EM *MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA*  
VON IHERING (HYMENOPTERA, VESPIDAE, POLISTINAE)**

**LAVRAS – MG  
2020**

**LUIZ ROBERTO DE OLIVEIRA**

**USO DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA COMO FERRAMENTA NO TESTE DE  
DIFERENÇAS ENTRE AS CASTAS SOCIAIS EM *MISCHOCYTTARUS*  
*CASSUNUNGA* VON IHERING (HYMENOPTERA, VESPIDAE, POLISTINAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador  
Dr. Marcel Gustavo Hermes

**LAVRAS – MG  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Luiz Roberto de.

O uso de morfometria geométrica como ferramenta no teste de diferenças entre as castas sociais em *Mischocyttarus cassununga* Von Ihreing (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) / Luiz Roberto de Oliveira. - 2020.

58 p. : il.

Orientador(a): Marcel Gustavo Hermes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Aculeata. 2. Diversidade morfológica. 3. Vespas sociais. I. Hermes, Marcel Gustavo. II. Título.

**LUIZ ROBERTO DE OLIVEIRA**

**USO DE MORFOMETRIA GEOMÉTRICA COMO FERRAMENTA NO TESTE DE  
DIFERENÇAS ENTRE AS CASTAS SOCIAIS *EM MISCHOCYTTARUS*  
*CASSUNUNGA* VON IHERING (HYMENOPTERA, VESPIDAE, POLISTINAE)**

**USE OF GEOMETRIC MORPHOMETRY AS A TOOL IN THE TEST OF  
DIFFERENCES BETWEEN SOCIAL CASTE IN *MISCHOCYTTARUS CASSUNUNGA*  
VON IHERING (HYMENOPTERA, VESPIDAE, POLISTINAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 12 de fevereiro de 2020.

Dr. Lucas Del Bianco Faria – UFLA

Dr. Fernando Barbosa Noll – UNESP

Dr. Marcel Gustavo Hermes

Orientador

**LAVRAS – MG  
2020**

Dedico aos meus pais pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha trajetória acadêmica.  
Este trabalho é dedicado a eles.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia e Sistemática de Insetos pelos momentos felizes durante esses anos.

Ao meu orientador Marcel Gustavo Hermes pela ajuda durante este período.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Muito obrigado!**

## RESUMO

Vespas construtoras de ninho de papel (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) são organismos-modelo para estudos sobre comportamentos sociais em Insecta, pois exibem organizações coloniais e mecanismos de diferenciação de castas variados. Entre os representantes do grupo, *Mischocyttarus cassununga* Von Ihering é uma espécie que apresenta fundação independente de ninhos e hierarquia colonial estável. Todavia, ainda assim a presença de castas com diferenciação morfológica marcante em *M. cassununga* é controversa. O presente estudo teve como objetivo utilizar técnicas de morfometria geométrica para evidenciar diferenças em estruturas corporais de fêmeas de *M. cassununga* de castas sociais distintas. Foram amostrados 27 ninhos, totalizando 102 espécimes, em duas áreas de coleta: o campus da Universidade Federal de Lavras (Lavras/MG) e a zona rural do município Campo do Meio/MG. Para a determinação prévia das castas foram considerados os seguintes critérios: (i) condição do desenvolvimento ovariano; (ii) idade relativa estimada por meio da coloração dos esternos metassomais; (iii) padrão de desgaste alar. Foram obtidas imagens de três estruturas corpóreas (clípeo, esterno II e asa) de cada exemplar, utilizando câmera digital Canon EOS Rebel T6 acoplada a microscópio estereoscópio. Foram inseridos marcos anatômicos nas imagens de cada estrutura com uso dos softwares Tpsutil v. 1.6 e Tpsdig v. 2.19, sendo estes marcos posteriormente sobrepostos por meio da Análise Generalizada de Procrustes (AGP). A diferença entre as castas foi testada utilizando análises de componentes principais (PCA), regressão para correção de efeitos de alometria, e análises discriminante e canônica. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software MorphoJ v. 2.0. Os resultados das análises estatísticas não demonstraram evidências de resultados significativos para separação de grupos com relação a casta em nenhuma das estruturas analisadas. Assim, foi verificada ausência de diferenciação morfológica, utilizando técnicas de morfometria geométrica, entre as castas de *M. cassununga*, sugerindo que as castas são determinadas por interações comportamentais entre os adultos.

**Palavras-chave:** Aculeata. diversidade morfológica. vespas sociais.

## ABSTRACT

Paper wasps (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) are model organisms for studies on social behavior within Insecta, as they exhibit colonial organizations and varied mechanisms of caste differentiation. Among the species of the group, *Mischocyttarus cassununga* von Ihering is a species that has independent nesting foundation and stable colonial hierarchy. Nevertheless, the presence of varieties with marked morphological differentiation in *M. cassununga* is still controversial. The present study aimed to use geometric morphometric techniques to evaluate possible differences in body structures of females of *M. cassununga* from different social castes. Twenty-seven nests were sampled, totaling 102 specimens, in two collection areas: the campus of the Universidade Federal de Lavras (Lavras / MG) and the rural area of Campo do Meio / MG. For the prior determination of the varieties the following criteria were considered: (i) stage of ovarian development; (ii) relative age estimated by staining of the metasomal sterna; (iii) pattern of wing wear. We obtained images of three body structures (clypeus, sternum II and wing) of each specimen, using a Canon EOS Rebel T6 digital camera coupled to a stereoscopic microscope. Anatomical landmarks were inserted in the images of each structure using Tpsutil v. 1.6 and Tpsdig v. 2.19, and these landmarks were later overlapped through the Generalized Procrust Analysis (AGP). The difference between the varieties was tested using principal component analysis (PCA), regression for correction of allometry effects, and discriminant and canonical analysis. All analyzes were performed using MorphoJ v. 2.0. The results of the statistical analyzes showed no evidence of significant results for caste separation in any of the structures analyzed. Thus, there was no morphological differentiation using geometric morphometry techniques among *M. cassununga* varieties, suggesting that the social castes are determined by behavioral interactions among adults.

Keywords: Aculeata. morphological diversity. social wasps.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 REFERÊNCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
2.1 Vespidae.....	10
2.2 Tribo Mischocyttarini: <i>Mischocyttarus cassununga</i> Von Ihering, 1903.....	11
2.3 Castas.....	12
2.4 Morfometria geométrica .....	14
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
<b>4. HIPÓTESES.....</b>	<b>16</b>
4.1 Hipótese Geral.....	16
4.2 Hipóteses específicas.....	16
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
5.1 Amostragem .....	16
5.2 Determinação de castas.....	18
5.3 Obtenção das imagens e estabelecimento dos marcos anatômicos .....	22
5.3.1 Obtenção de marcos anatômicos na cabeça.....	22
5.3.2 Obtenção dos marcos anatômicos nas asas.....	23
5.3.3 Obtenção dos marcos anatômicos no metassoma .....	26
5.4 Análises morfométricas .....	29
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
6.1 Determinação de castas .....	30
6.1.1 Desenvolvimento ovariano .....	31
6.1.2 Idade relativa.....	32
6.1.3 Desgaste alar.....	32
6.2 Análises morfométricas.....	33
6.2.1 Clípeo .....	33
6.2.2 Asas anteriores e posteriores.....	37
6.2.3 Esterno metassomal VI .....	43
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>46</b>
<b>8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo as características e condições dos comportamentos sociais em Insecta têm sido tradicionalmente focados em grupos com maior apelo econômico e mais facilmente reconhecidos pela população em geral, como abelhas, formigas e cupins (RIBEIRO, 2009). Para outros grupos, como os vespídeos sociais (Hymenoptera, Vespidae: Stenogastrinae, Polistinae, Vespinae), os conhecimentos acerca destes comportamentos são comparativamente escassos e debatidos (MURAKAMI; SHIMA; DESUÓ, 2009; 2013; SMITH et al., 2011; JANDT; TIBBETTS; TOTH, 2013; MONTAGANA et al., 2015).

Uma das questões ainda não esclarecidas em muitas das espécies de vespas sociais é a divisão das tarefas da colônia entre os indivíduos, separando-os em grupos hierárquicos denominados castas (rainhas e operárias) (JEANNE, 1980). Nos Vespinae existe uma clara diferenciação morfológica entre operárias e rainhas, e a determinação de castas nestes grupos ocorre antes da emergência do adulto (pré-imaginal) (BLACKITH, 1958; FOSTER et al., 2001). Entretanto, em outros grupos, como as vespas sociais pertencentes a tribo *Mischocyttarini* (subfamília Polistinae), a presença de castas morfológicas é menos pronunciada ou ausente, sendo que os fatores que atuam na determinação das castas ainda são pouco compreendidos (NODA, 2005; CUNHA et al., 2017).

Um dos organismos-modelo desta tribo para que se compreenda as condições para a determinação das castas e a presença de diferenciação morfológica, é a vespa social *Mischocyttarus cassununga* Von Ihering, 1903 (PENNA et al., 2007). O sistema de castas nesta espécie se baseia na divisão de tarefas entre fêmeas reprodutivas (rainhas) e não reprodutivas (operárias). As tarefas intranidais são desempenhadas pelas rainhas, enquanto a busca de recursos é realizada majoritariamente pelas operárias (PREZZOTO et al., 2004).

Os estudos sobre diferenciações morfológicas entre castas em Vespidae utilizam em sua maioria técnicas de morfometria tradicional, em que medidas lineares são a base para mensurar diferenças no tamanho entre os indivíduos componentes de uma colônia (KEEPING, 2002). Porém a utilização de uma técnica relativamente recente, a morfometria geométrica, tem proporcionado uma nova abordagem em estudos com vespas sociais relacionados a diferenciação de forma entre as castas (PERRARD et al., 2012; PERRARD; LOOPE, 2015; DAPPORTO; PETROCELLI; TURILLAZZI, 2011).

Neste estudo objetivou-se testar métodos de morfometria geométrica como uma possível ferramenta para a diferenciação de castas sociais em *M. cassununga*, utilizando

estruturas corporais para buscar evidências de diferenciação morfológica entre as castas rainha e operária.

## 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1 Vespidae

A família Vespidae apresenta 5271 espécies descritas distribuídas em 262 gêneros (PIEKARSKI et al., 2018). Atualmente a família encontra-se subdividida em nove subfamílias atuais: Euparaginae (10 spp.), Masarinae (359 spp.), Eumeninae (3404), Gayellinae (11 spp.), Zethinae (335 spp.), Raphidoglosinae (16 spp.), Stenogastrinae (63 spp.), Polistinae (1003) e Vespinae (70 spp.) (PIEKARSKI et al., 2018). Destas, apenas as três últimas apresentam comportamentos eussociais, isto é, possuem: (i) sobreposição de gerações, (ii) cuidado cooperativo da prole e (iii) divisão reprodutiva do trabalho (WILSON; HÖLLDOBLER 2005).

Os vespídeos são insetos que possuem níveis variados de organização social, exibindo comportamentos desde o tipo solitário, como o encontrado em Eumeninae, até o social com construção e compartilhamento de ninho, como o encontrado nos Vespinae (CARPENTER, 1991; HINES et al., 2007; HUNT, 2012; REHAN; TOTH, 2015). Estudos moleculares recentes propuseram que o comportamento eussocial nos vespídeos teria duas origens evolutivas independentes, uma para a subfamília Stenogastrinae, e outra para o clado Polistinae + Vespinae (BANK et al., 2017; PIEKARSKI et al., 2018). Esse cenário filogenético ressalta a importância do grupo para estudos relacionados a evolução da eussocialidade (HINES et al., 2007; PIEKARSKI, 2014).

Stenogastrinae compreende vespas eussociais de distribuição asiática (RICHARDS, 1971). As colônias são pequenas, raramente apresentando um número maior que seis fêmeas por ninho (HUNT, 2012; TURILLAZZI, 2012). As fêmeas são morfológicamente semelhantes, sendo todas capazes de produzir seus próprios descendentes, uma vez que não ocorre inibição do desenvolvimento ovariano. As fêmeas recém emergidas são operárias temporárias, auxiliando as rainhas até que seus ovários estejam desenvolvidos (TURILLAZZI, 1989).

Os Vespinae são exclusivamente de clima temperado, ocorrendo na Europa, América do Norte e no sudeste da Ásia (RICHARDS, 1971). Dentre as vespas sociais, o dimorfismo entre as castas rainha e operária é mais evidente nesta subfamília, em que geralmente a rainha é muito maior que as operárias (SPRADBERRY, 1972). Neste grupo a rainha inibe o

desenvolvimento ovariano das operárias por meio da liberação de feromônios (GRENNE, 1991).

A subfamília Polistinae possui uma condição intermediária entre Stenogastrinae e Vespinae, apresentando desde espécies com diferenças morfológicas evidentes, até espécies sem diferenciação morfológica (FELIPPOTTI et al., 2009; TORRES et al., 2014; BIAGIOTTO; SHIMA, 2017). Em alguns gêneros, como *Polistes* e *Mischocyttarus*, as fêmeas fundam seus ninhos de forma independente, exibindo sistemas de dominância e subordinação que são baseados em interações agonísticas entre os indivíduos, em que cada indivíduo se comporta de acordo com a sua posição hierárquica (ROCHA; GIANNOTTI, 2016).

## **2.2 Tribo Mischocyttarini: *Mischocyttarus cassununga* Von Ihering, 1903**

Dentre os Polistinae, são reconhecidas quatro tribos: Ropalidiini, Epiponini, Polistini e Mischocyttarini (CARPENTER, 1982; 2004). Ropalidiini é composta pelos gêneros *Ropalidia*, *Parapolybia*, *Polybioides* e *Belonogaster*, já a tribo Epiponini é representada por 19 gêneros predominantemente neotropicais. Polistini e Mischocyttarini são representadas por apenas um gênero cada: o gênero *Polistes* e o gênero *Mischocyttarus*, respectivamente. Este último conta com aproximadamente 250 espécies descritas (CARPENTER; MARQUES, 2001; CARPENTER, 2004; SILVEIRA, 2008).

Os integrantes da tribo Mischocyttarini são caracterizados por apresentarem o terceiro e o quarto tarsômeros das pernas medianas e posteriores assimétricos, com os lobos internos maiores que os externos (RICHARDS, 1978). Este grupo possui distribuição essencialmente Neotropical, com apenas umas poucas espécies com ocorrência na região Neártica (RICHARDS, 1978; SILVEIRA, 2008).

Os Mischocyttarini apresentam colônias relativamente pequenas (raramente com mais que 100 indivíduos adultos), ciclo colônial curto e diferenças morfológicas entre rainhas e operárias consideradas inexistentes em diversas espécies (MURAKAMI; SHIMA; DESUÓ, 2009; BIAGIOTTO; SHIMA, 2017). As funções desempenhadas pelos adultos podem alterar, visto que diversos estudos relatam a ausência de controle químico das rainhas sobre as operárias, que podem apresentar desenvolvimento ovariano em determinadas condições (CHANDRASHEKARA; GADAGKAR, 1991; GADAGKAR, 1991).

Dentre as espécies que compõem este gênero pode-se citar *Mischocyttarus cassununga* Von Ihering, 1903. *M. cassununga* é uma vespa eussocial que apresenta ninho descoberto e formado por um único favo, que é preso ao substrato por um pedúnculo. Nestes vespídeos, a

forma de fundação de novos ninhos é independente, tanto por haplometrose, com uma fêmea inseminada atuando na fundação do novo ninho, quanto pela associação de algumas fêmeas, condição chamada de pleometrose (CASTRO et al., 2014).

Quando os indivíduos desta espécie estão presentes no ninho eles interagem de acordo com o *status* social de cada indivíduo e padrões de comportamentos podem apresentar variações intraespecíficas de acordo com a estabilidade hierárquica presente (LITTE, 1979; HERMANN e CHAO, 1984; TORRES et al., 2012). De forma geral, as fêmeas dominantes (rainhas), apresentam comportamentos característicos de dominância quando interagem com as operárias, que demonstram comportamentos de subordinação (CECÍLIO; ROCHA; GIANNOTTI, 2016). Devido a estas características, as interações entre os indivíduos presentes no ninho desempenham um papel importante na organização social, auxiliando na manutenção da estabilidade da hierarquia presente nas colônias (SOARES; TORRES; ANTONIALLI-JUNIOR, 2014).

Aspectos comportamentais e fisiológicos são utilizados como critério para a diferenciação de rainhas e operárias em grupos que não exibem diferenciação morfológica evidente (KEEPING, 2002; DESUÓ et al., 2011; MURAKAMI, 2012). A posição social das fêmeas está diretamente relacionada a sua fisiologia reprodutiva de modo que o comportamento de dominância mantém as operárias com os ovários não desenvolvidos, devido a diferenças de quantidade e qualidade do alimento ingerido (O'DONNELL, 1998).

Estudos com *M. cassununga* têm mostrado que a hierarquia presente nesta espécie é estável quando comparada a outras espécies do mesmo gênero (ITO, 1984; NODA; SILVA; GIANNOTTI, 2001; PREZOTO et al., 2004). Esta condição torna a espécie importante para estudos que busquem elucidar os mecanismos envolvidos na diferenciação de castas, visto que a rainha apresenta grande longevidade, obtendo controle do seu status durante todo o ciclo de desenvolvimento da colônia (PENNA et al., 2007; ALVES et al., 2012).

Os conflitos hierárquicos em *M. cassununga* são praticamente inexistentes, indicando a existência de um mecanismo eficiente de determinação do status social dos indivíduos na colônia (CASTRO et al., 2014). Os estudos com *M. cassununga* podem contribuir para que se compreenda os padrões de organização social em vespas de fundação independente, bem como auxiliar no entendimento de como ocorre a determinação das castas nas vespas sociais no geral (CASTRO; GUIMARÃES; PREZOTO, 2011; BIAGIOTTO; SHIMA, 2017).

### 2.3 Castas

Um modo de se compreender a socialidade de um táxon específico está relacionado com a forma com que as relações entre os indivíduos se estabelecem na colônia (JEANNE, 1986). Por isso um ponto chave no estudo dos chamados insetos eussociais, como é o caso das vespas da subfamília Polistinae, é o entendimento de como os indivíduos se organizam em castas sociais (JEANNE 1980). Além disso, um dos critérios tradicionalmente elencado para definir a eussocialidade é a presença da divisão do tralho reprodutivo, com castas estéreis (CRESPI; YANEGA, 1995).

Entretanto, alguns autores afirmam que a presença de uma casta estéril permanente não deveria ser considerada um critério para a eussocialidade, uma vez que há espécies que apresentam flexibilidade em relação ao papel desempenhado pelos indivíduos durante a ontogenia da colônia (KELLER; PERRIN, 1995; SHERMAN et al., 1995). Outros autores defendem que é obrigatória a presença de uma casta estéril permanente no contexto eussocial, de modo que não poderiam ocorrer mudanças de posição na hierarquia colonial (TSUJI, 1992; CRESPI; YANEDA, 1995). Villet (1992) estipulou que o termo “casta” poderia ser utilizado somente para espécies que apresentam diferenças morfológicas entre indivíduos resultantes de padrões diferenciados de desenvolvimento, portanto, segundo esta definição, os indivíduos pertenceriam a castas morfológicas distintas independentemente da função desempenhada na colônia.

O'Donnel (1998) propõe que este termo deveria ser utilizado para grupos que apresentem um polifenismo reprodutivo, e não seria necessária a diferenciação morfológica externa. Para este autor a determinação da casta ocorreria durante o desenvolvimento embrionário, sendo um processo irreversível. De fato, em algumas espécies de vespídeos existe uma clara determinação pré-imaginal das castas e as operárias são completamente estéreis (SCHMIDT; HUNT; SMITH, 2012).

No presente estudo o termo casta segue as condições propostas por Wilson (1979), que define casta como um subgrupo dentro dos membros da colônia, que são geneticamente, mas não anatomicamente e fisiologicamente semelhantes, e que são especializados em tarefas particulares por prolongados períodos. Com base nesta definição as castas em vespas sociais representam as rainhas que exercem comportamentos de dominância e possuem o controle da atividade reprodutiva, e as operárias que demonstram comportamentos de subordinação e exercem as atividades de forrageamento (JEANNE, 1980; RICHTER, 2000).

Os mecanismos de diferenciação de castas entre as fêmeas de vespas sociais ainda não estão esclarecidos, sendo a presença de uma determinação pré-imaginal e de castas morfológicas ainda debatida em diversos grupos. Assim o uso de novas técnicas, como é o caso

da morfometria geométrica, pode elucidar como as castas podem ser diferenciadas nesse grupo de vespas.

## 2.4 Morfometria geométrica

A compreensão das formas dos organismos é um dos mais antigos temas investigados nas Ciências Naturais (ZELDITCH; SWIDERSKI; SHEETS, 2004). Todavia, o termo “morfologia” foi cunhado somente no século XVIII, no ano de 1790 pelo naturalista e poeta alemão Johan Wolfgang von Goethe (1749-1832). Goethe definiu morfologia como o “estudo da forma” ou mais precisamente o estudo das formas orgânicas (KARDONG, 1995).

Inicialmente, qualquer metodologia que visasse a análise quantitativa de variações morfológicas era referida como morfometria. Estudos pioneiros nesse campo se baseavam em comparações de valores médios de medidas de uma estrutura analisada, construindo o que se denomina de morfometria tradicional (ROHLF et al., 1993). Técnicas morfométricas tradicionais são utilizadas para diferentes fins, inclusive na busca por critérios para a delimitação de castas em insetos sociais (MONTEIRO; REIS, 1999; DUJARDIM, 2008).

Já a morfometria geométrica ou análise estatística da forma pode ser definida como “um conjunto de métodos de aquisição, processamento e análise de variáveis de forma que preserva toda a informação geométrica contida nos dados originais” (SLICE 2005). Todos os dados que são utilizados em morfometria geométrica não são baseados em medidas ou ângulos, mas sim em coordenadas cartesianas chamadas marcos anatômicos (landmarks). Estas coordenadas podem ser definidas num plano e ter duas dimensões ou em um espaço com três dimensões (ROHLF, 1990; ROHLF; MARCOS, 1993; MONTEIRO; REIS 1999).

A morfometria geométrica, em relação a tradicional, é mais eficiente na captura da informação relacionada à forma do organismo (MONTEIRO; REIS 1999). Outra vantagem desta técnica é permitir a reconstrução das variações da forma inferidas estatisticamente, sendo importante na visualização das diferenças da forma, ou seja, identificar como, onde e em que magnitude estão ocorrendo as mudanças (FORNEL; CORDEIRO-ESTRELA, 2012).

Algumas análises multivariadas são utilizadas na morfometria geométrica, como a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Funções Discriminantes (AFD), sendo utilizadas para verificar se ocorre ou não a formação de grupos heterogêneos. A PCA também possui o objetivo de verificar se alguns componentes analisados são capazes de explicar a maior parte da variação das características (MONTEIRO; REIS, 1999).

Estudo morfológicos utilizando técnicas de morfometria geométrica vem demonstrando resultados positivos na constatação de diferenças na forma de estruturas em diversos grupos. Moraes (2003) analisou crânio de roedores em diferentes estágios ontogênicos, Sungvornyothin et al. (2004) demonstrou a eficiência desta técnica em estudo com ácaros, e Albertson e Kocher (2005) em suas análises morfológicas em duas espécies de peixes.

Esta técnica está sendo utilizada na Entomologia Forense como ferramenta para identificação de espécies de dípteros por meio da análise do padrão de venação alar (MACEDO, 2016; SONTIGUN et al., 2019). Nos insetos sociais é utilizada em estudos com abelhas sociais, como ferramenta para a identificação tanto de subespécies como de castas sociais (FRANCOY; FONSECA, 2010; DE SOUZA et al., 2015; NAWROCKA et al., 2018).

Perrard et al. (2012) utilizou esta técnica como forma de demonstrar a presença de diferenças de forma com relação a castas em três espécies de Vespinae. Dapporto, Petrocelli e Turillazzi (2011) demonstraram a presença de diferenciação entre castas em *Polistes gallicus* analisando a forma do último esterno metassomal, sugerindo a presença de determinação pré-imaginal nesta espécie.

Devido as características relacionadas ao comportamento social demonstradas por *M. cassununga* em estudos anteriores e o potencial estatístico das técnicas de morfometria geométrica, o presente estudo tem como objetivo avaliar a existência de possível diferenciação morfológica entre as castas rainha e operária, com relação a forma de estruturas corporais, utilizando morfometria geométrica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo avaliar a existência de diferenciação morfológica entre as castas operária e rainha em *M. cassununga*, utilizando técnicas de morfometria geométrica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Investigar a possível existência de diferenças entre as castas operária e rainha com relação a forma do clipeo de *M. cassununga*.



- Investigar a possível existência de diferenças entre as castas operária e rainha com relação a forma das asas anteriores e posteriores de *M. cassununga*.
- Investigar a possível existência de diferenças entre as castas operária e rainha com relação a forma de esterno metassomal VI de *M. cassununga*.
- Testar o potencial de técnicas de morfometria geométrica como ferramenta na investigação sobre diferenciação morfológica de castas com relação a forma de estruturas em vespas socais.

## 4. HIPÓTESES

### 4.1 Hipótese Geral

- Existe diferenças na forma de estruturas corporais entre as castas operária e rainha de *M. cassununga*.

### 4.2 Hipóteses específicas

- Existe diferença da forma do clipeo entre as operárias e rainhas de *M. cassununga*.
- Existe diferenças da forma das asas anteriores e posteriores entre operárias e rainhas de *M. cassununga*.
- Existe diferença da forma do esterno metassomal VI entre operárias e rainhas de *M. cassununga*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Amostragem

Indivíduos de *Mischocyttarus cassununga* foram amostrados em duas áreas: (A) zona rural do município de Campo do Meio, Minas Gerais, Brasil (21°06'25"S, 45°49'48"W); (B) campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA) no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°14'43"S, 44°59'27"W) (FIGURA 1). Foram localizados e coletados 27 ninhos, totalizando 102 espécimes, considerando ambas as áreas de coleta.

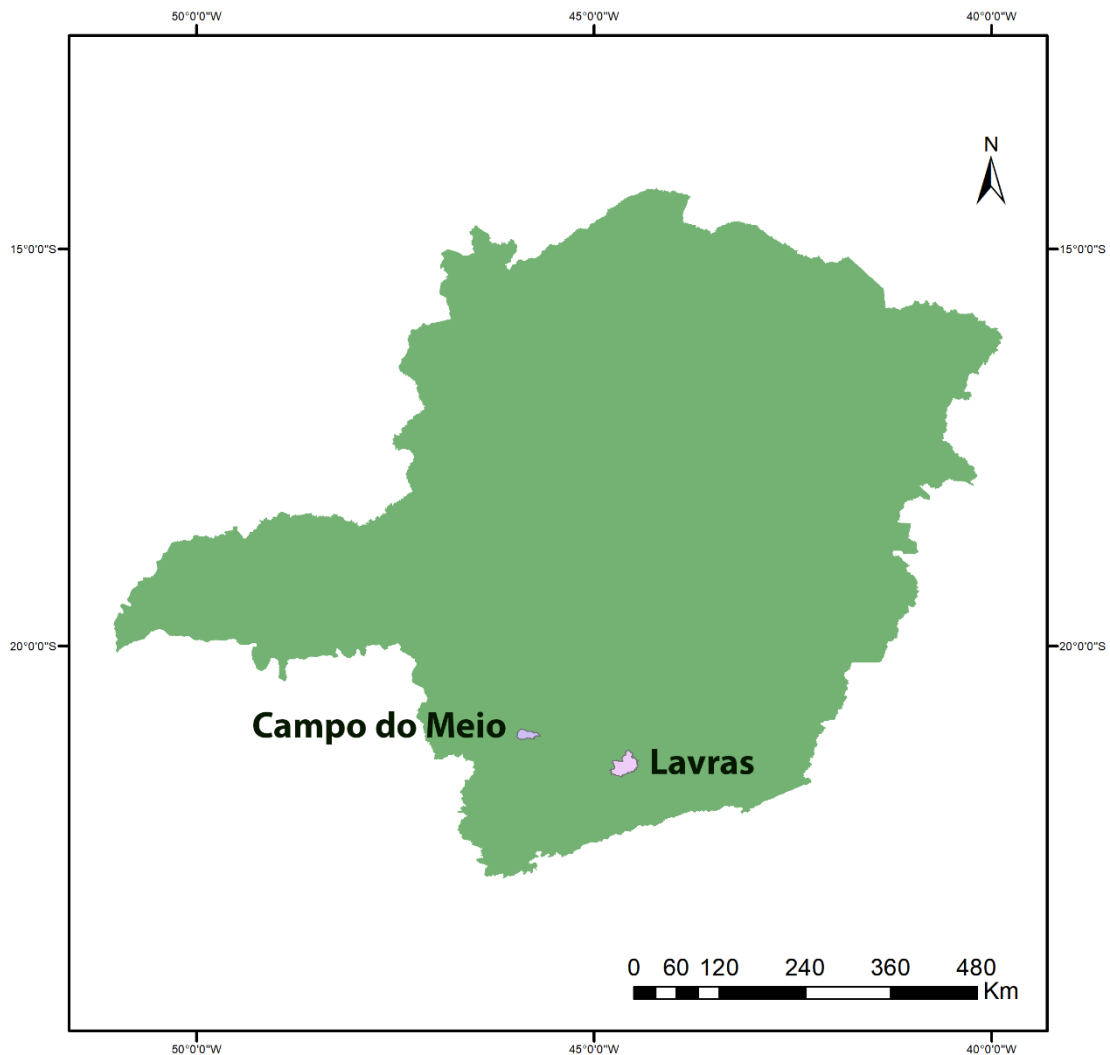
Os ninhos foram localizados por meio de busca ativa. Os indivíduos foram identificados até o nível de espécie utilizando a chave de identificação de Vespidae proposta por Hermes e Kohler (2004) e Richards (1978), além de comparação com espécimes identificados por

especialistas. As coletas foram realizadas no início da noite, pois neste período seria mais provável que os indivíduos estivessem presentes no ninho, de acordo com os hábitos de forrageamento observados em vespas socais (MURAKAMI; DESUÓ; SHIMA, 2013). Todos os ninhos encontrados foram coletados independentemente do número de indivíduos e período do ano.

Após a coleta os espécimes foram colocados em um recipiente contendo em seu interior algodão embebido com acetato de etila, incluindo os adultos que emergiram após a coleta, sendo posteriormente armazenados em tubos Eppendorf contendo álcool 70% e conservados no freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Os espécimes foram identificados de acordo com o ninho, local e data de coleta.

Os espécimes coletados para o presente estudo estão depositados na Coleção Entomológica da Universidade Federal de Lavras (CEUFLA), já os ninhos coletados estão armazenados no Laboratório de Sistemática e Biologia de Insetos (LSBI), pertencente a mesma instituição. Todas as imagens de interesse do presente estudo foram obtidas com a câmera digital Canon EOS Rebel T6 acoplada ao microscópio estereoscópico Leica S8 APO.

Figura 1 – Mapa do estado de Minas Gerais representando a localização geográfica dos municípios em que foram amostrados os ninhos: (A) município de Campo do Meio; (B) município de Lavras.



Fonte: Do autor (2020).

## 5.2 Determinação de castas

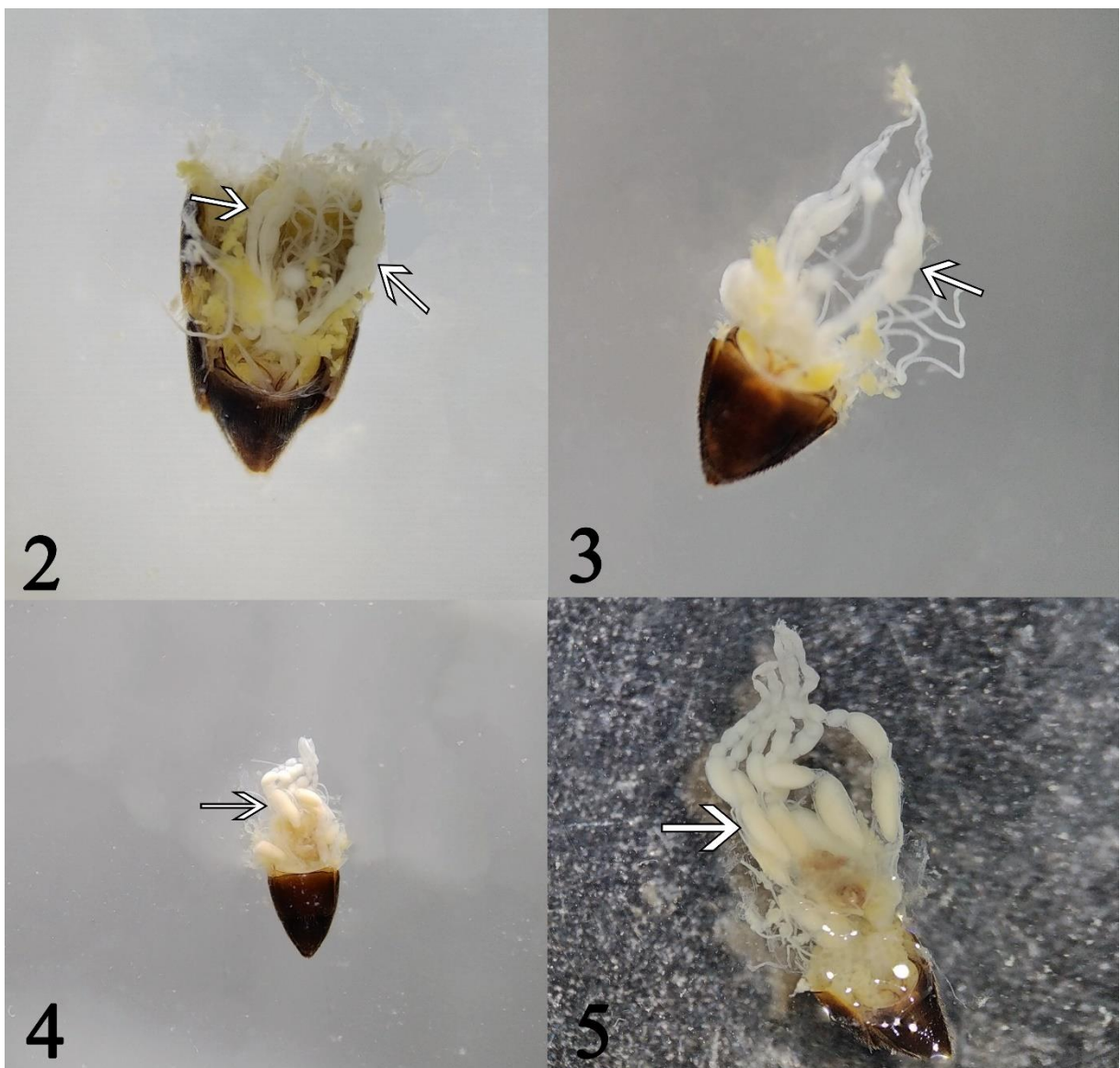
Os indivíduos foram coletados previamente, categorizados em castas sociais por meio de análises morfofisiológicas já realizadas em outros estudos (GALEANO, 2010; MURAKAMI 2012). Para a realização das análises morfofisiológicas todos os indivíduos presentes na colônia foram inicialmente armazenados em álcool 70%. Foram desconsiderados os machos e todas as fêmeas foram dissecadas e submetidas a seguintes análises:

**i. Desenvolvimento ovariano** (FIGURAS 2 a 5): Para a análise do desenvolvimento ovariano, o gáster de cada fêmea foi imerso em uma placa de Petri contendo álcool 70%, visando evitar desidratação durante o processo. A dissecação foi feita com o auxílio de alfinetes

entomológicos fixados a hastes de madeira. Os esternos foram retirados para facilitar a observação da condição do desenvolvimento do ovário.

Todos os ovários foram fotografados e a condição do desenvolvimento foi comparada entre as fêmeas presentes no ninho. Elas foram agrupadas em três grupos, (1) ovário não desenvolvido; (2) ovário desenvolvido; e (3) ovário muito desenvolvido (MURAKAMI; SHIMA, 2006; MURAKAMI, 2012; MONTAGNA; ANTONIALLI-JUNIOR, 2016).

Figuras 2 a 5 – Padrão de desenvolvimento ovariano encontrados nos espécimes. 2 e 3 representam ovários não desenvolvido com ovariolos filamentosos. 4 representa um ovário desenvolvido com ovócitos desenvolvidos. 5 representa um ovário muito desenvolvido, com diversos ovócitos desenvolvidos.

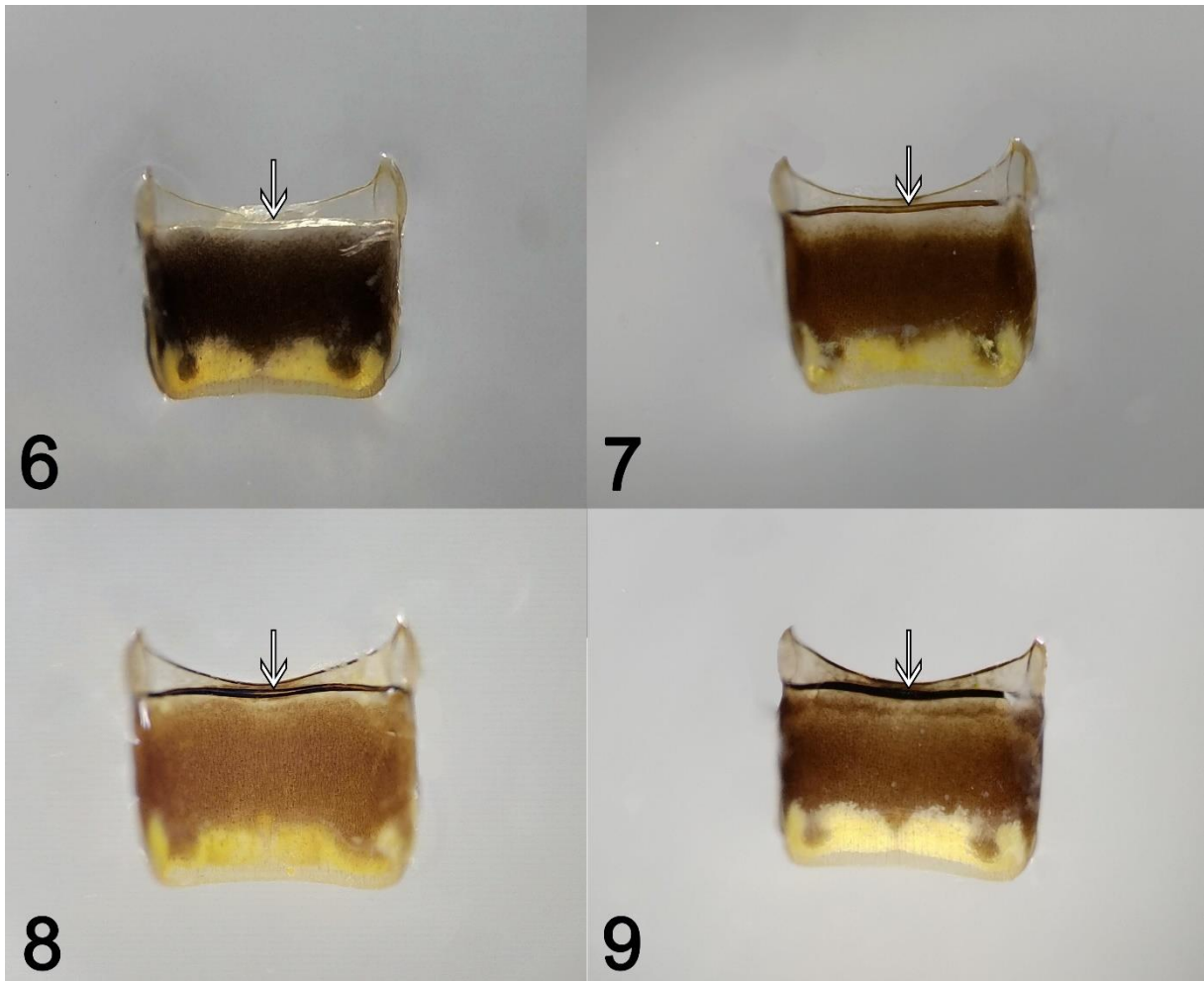


Fonte: Do autor (2020).

**i. Idade relativa (FIGURAS 6 a 9):** Para esta análise foi utilizado como referência o grau de pigmentação do apódema transverso do esterno metassomal III. Todas as fêmeas foram

analisadas de acordo com a idade relativa, e classificadas em dois grupos: (1) jovens e (2) velhas, de acordo com o padrão da pigmentação do apódema transverso (conforme as Figuras 6 a 9). As fêmeas mais velhas com apódemas mais pigmentado foram consideradas rainhas, já as fêmeas mais jovens com apódemas menos pigmentados foram consideradas operárias.

Figuras 6 a 9 – Idade relativa de acordo com o padrão de pigmentação do apódema transverso do terceiro esterno metassomal em *M. cassununga*. Tipo 6 e 7 representam fêmeas jovens. Tipos 8 e 9 representam fêmeas mais velhas. As setas indicam o padrão de pigmentação.



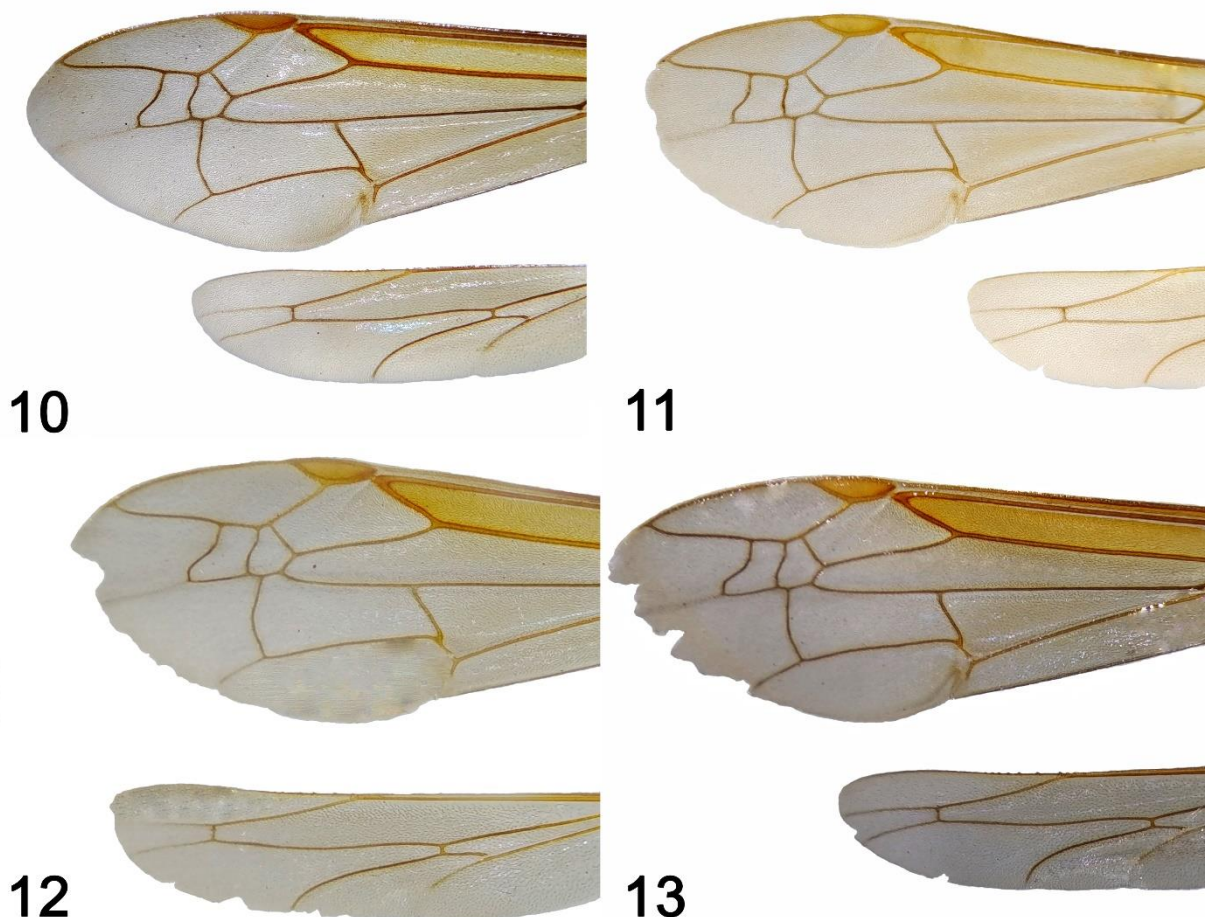
Fonte: Do autor (2020).

**iii. Desgaste alar (FIGURAS 10 a 13):** O padrão de desgaste alar encontrado na porção apical das asas em vespas sociais foi proposto por Noll (1995) como um método para auxiliar na identificação de castas. Esta análise fornece algumas informações sobre o indivíduo: (1) idade relativa: o desgaste alar, associado a idade relativa pode gerar estimativas mais precisas sobre a idade dos indivíduos; (2) forrageamento: fêmeas forrageadoras normalmente apresentam maior desgaste alar associado ao ato de forragear ser desempenhado

majoritariamente pelas operárias; (3) interações agonísticas: as interações entre os indivíduos no ninho podem levar a danos nas asas e em outras estruturas corporais (GALEANO, 2010; GARCIA; NOLL, 2013).

Para as comparações foram utilizadas imagens das asas anterior direita e posterior direita de todos os indivíduos. Os espécimes foram agrupados em três categorias de acordo com o padrão de desgaste encontrado na porção apical de ambas as asas, sendo eles: (1) asas sem desgastes; (2) asas com pouco desgaste; (3) asas com desgaste. Os padrões estão representados nas Figuras 10 a 13. As fêmeas que apresentavam menor desgaste alar quando comparadas a outras presentes no mesmo ninho foram consideradas rainhas.

Figuras 10 a 13 – Padrão de desgaste alar encontrado as asas anteriores e posteriores. A imagem 10 representa asas sem desgaste, 11 e 12 asas com pouco desgaste, e 13 asas com muito desgaste. Padrão adaptado de Garcia e Noll (2013).



Fonte: Do autor (2020)

Foram determinadas as castas de todos os indivíduos analisados valendo-se desses três critérios. Os critérios foram aplicados para cada ninho individualmente, de acordo com a

condições observadas. Buscou-se, quando possível, pela congruência entre mais de um critério para a determinação dos indivíduos assinalados como rainhas ou operárias.

### **5.3 Obtenção das imagens e estabelecimento dos marcos anatômicos**

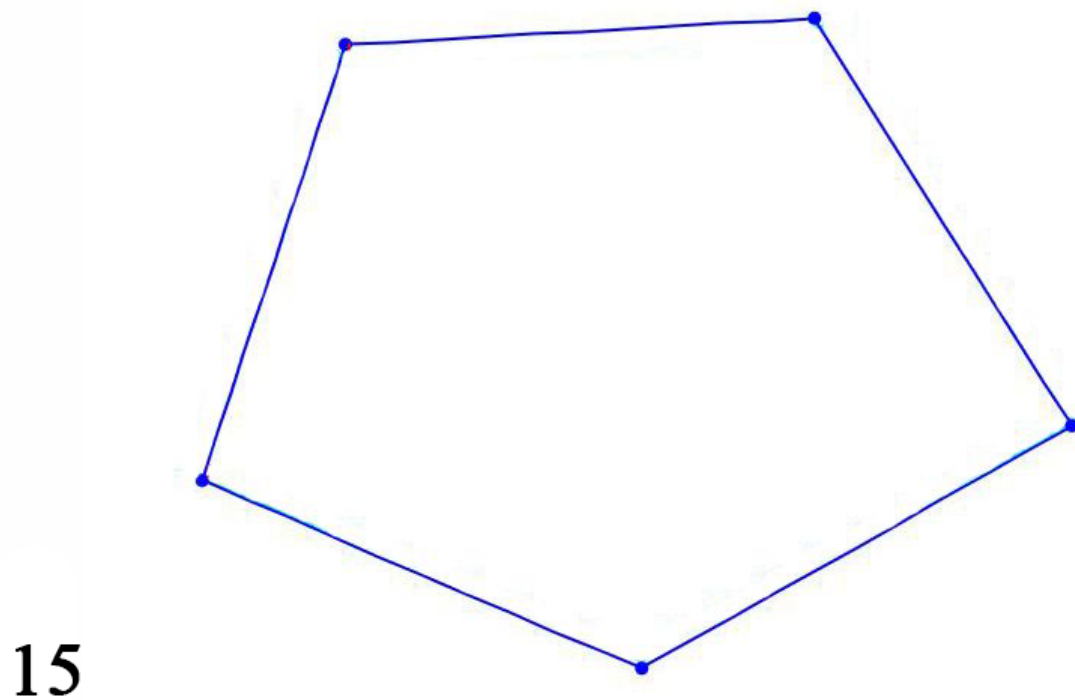
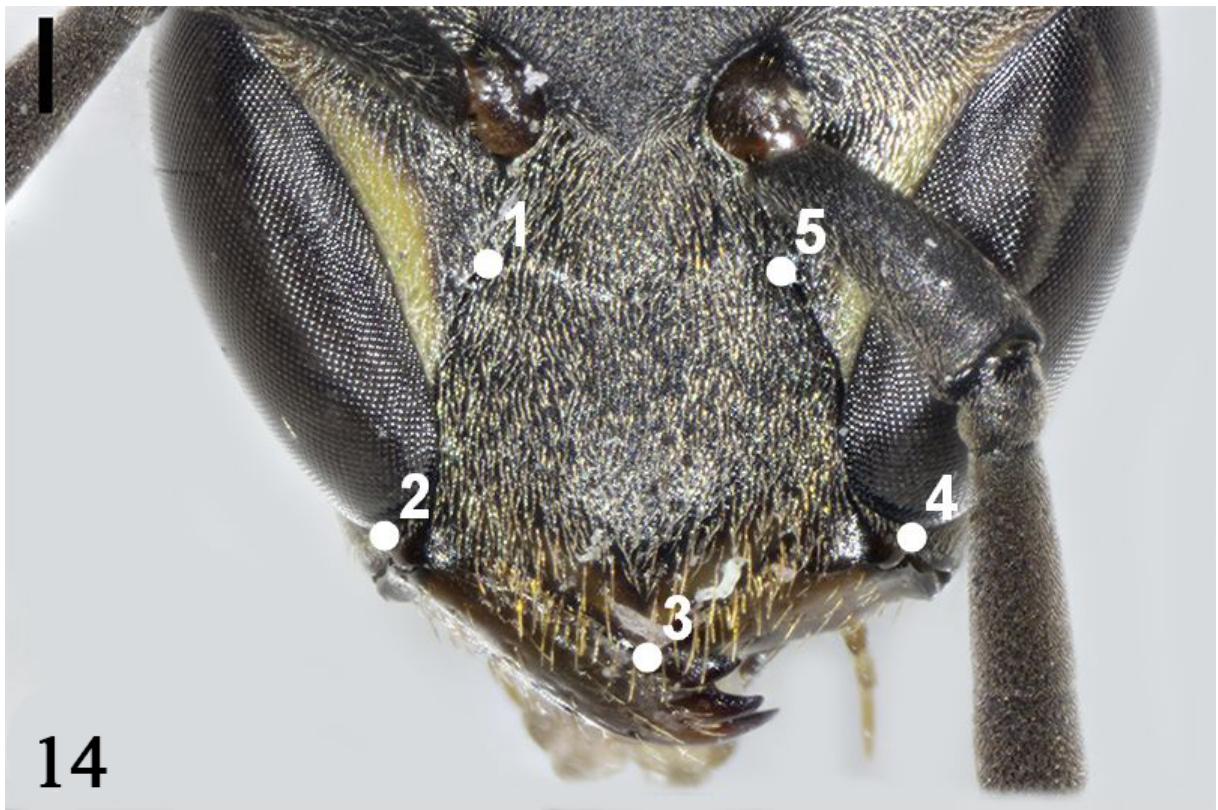
Para as análises morfométricas foram selecionadas regiões do corpo dos insetos para o estabelecimento dos marcos anatômicos (landmarks) que poderiam ser planificados em duas dimensões. As regiões escolhidas foram: a cabeça (clípeo); metassoma (esterno metassomal IV) e asas (asa anterior direita e asa posterior direita). Foi estabelecido um padrão para cada estrutura fotografada, de forma que todas as imagens seguissem o padrão preestabelecido.

Os marcos anatômicos foram estabelecidos em todas as fotos seguindo o padrão de referência de cada estrutura (FIGURAS 14 a 21). Todas as imagens foram identificadas com o nome da estrutura analisada; ninho ao qual o indivíduo pertence; indivíduo que foi retirada a estrutura; e local da coleta. Todos os dados com as informações sobre os indivíduos e as estruturas foram catalogados em uma planilha no Excel, constituindo um banco de dados de referência.

#### **5.3.1 Obtenção de marcos anatômicos na cabeça**

Nesta região foi utilizado o clípeo para o estabelecimento dos marcos anatômicos. Inicialmente a cabeça de cada indivíduo foi destacada do restante do corpo com o auxílio de uma tesoura entomológica. Após isso, a cabeça foi colocada em uma placa de Petri 90 x 15 mm para facilitar a padronização das imagens. Os marcos anatômicos utilizados seguiram o padrão proposto no presente estudo e representado nas Figuras 14 e 15.

Figuras 14 e 15 – Padrão estabelecido para a obtenção das imagens do clipeo. Os círculos representam os marcos anatômicos delimitados para esta região, os números correspondem a sequência de estabelecimento dos marcos. Barra de escala = 1mm.



Fonte: Do autor (2020).

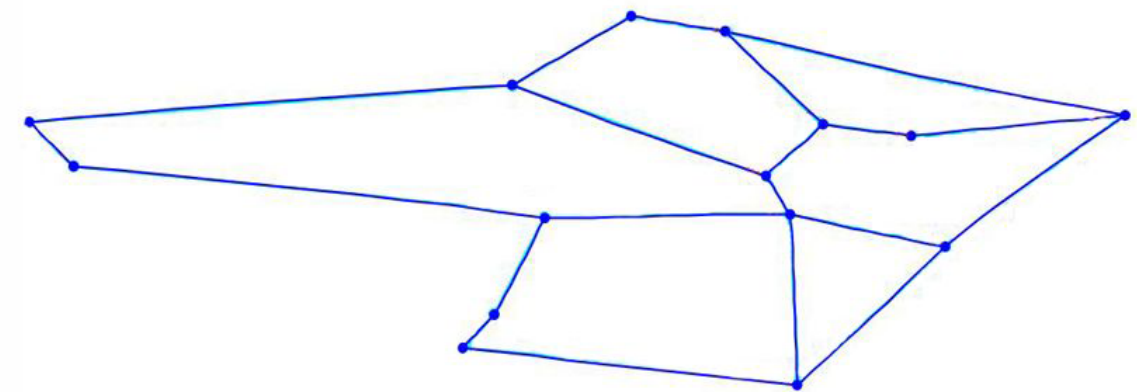
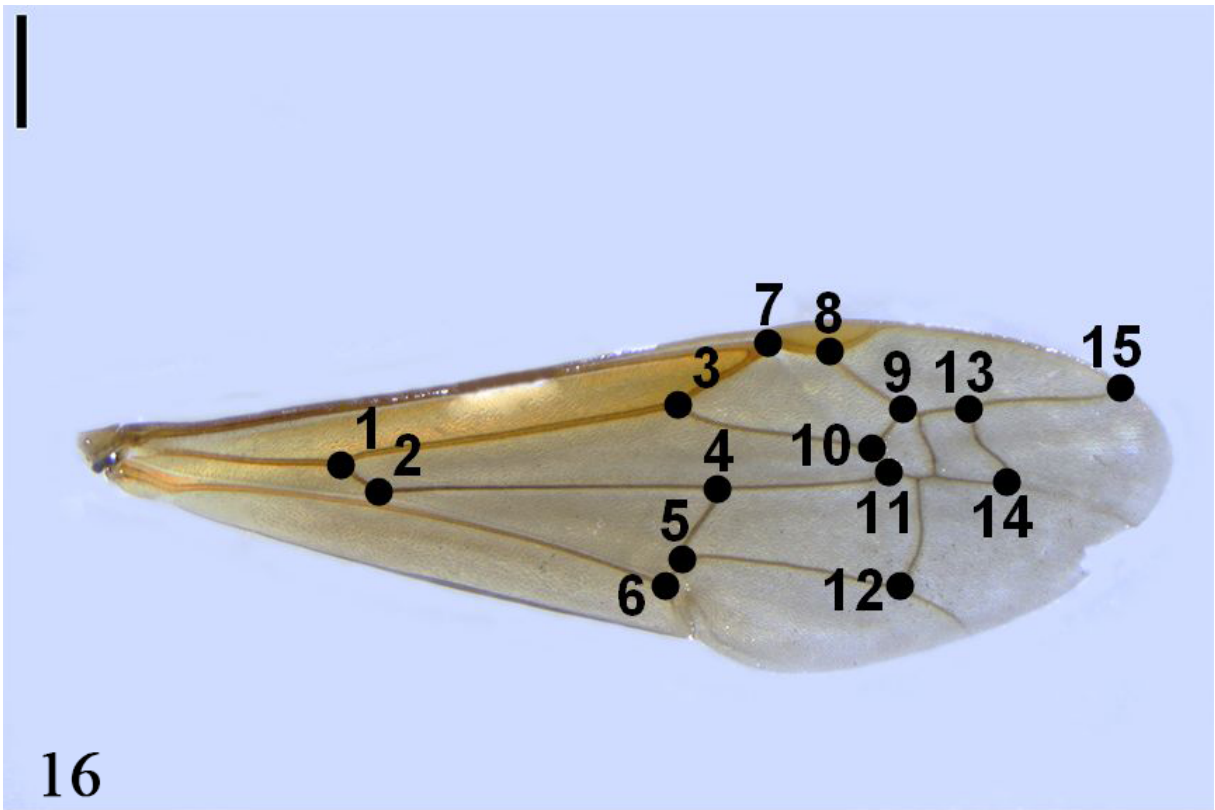
### 5.3.2 Obtenção dos marcos anatômicos nas asas



Ambas as asas direitas (anterior e posterior) foram removidas do restante do corpo com o auxílio de uma tesoura entomológica para facilitar a padronização e a obtenção das fotografias. Posteriormente cada asa foi colocada em uma placa de Petri 90 x 15 mm e umedecida com álcool 70% para facilitar a planificação da estrutura.

Os marcos anatômicos foram selecionados seguindo um padrão adaptado do utilizado nos estudos de Perrard et al. (2012, 2015). As adaptações foram necessárias devido as características do padrão de venação alar encontrado em *M. cassununga*, os marcos anatômicos estabelecidos para as asas anteriores e posteriores estão representados nas Figuras 16 a 19.

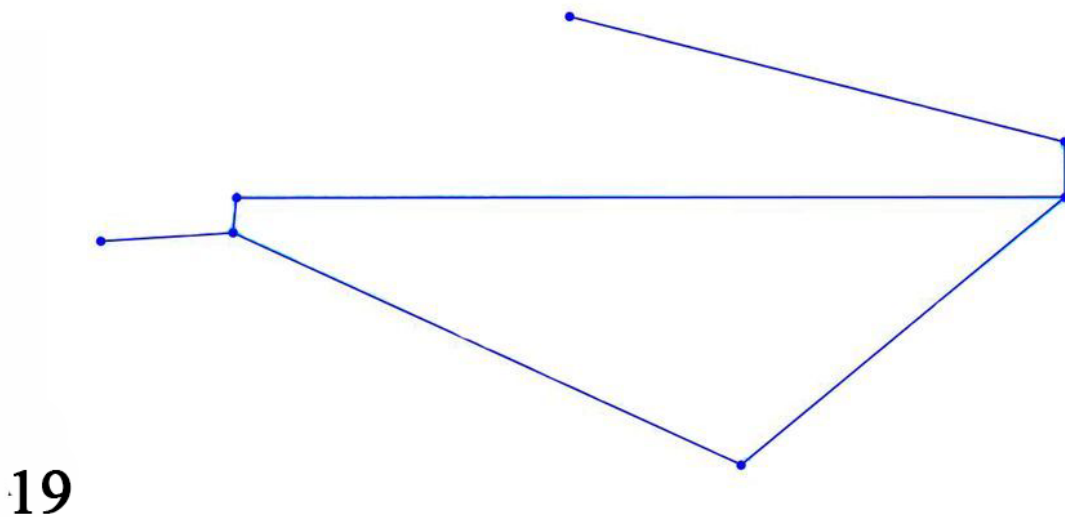
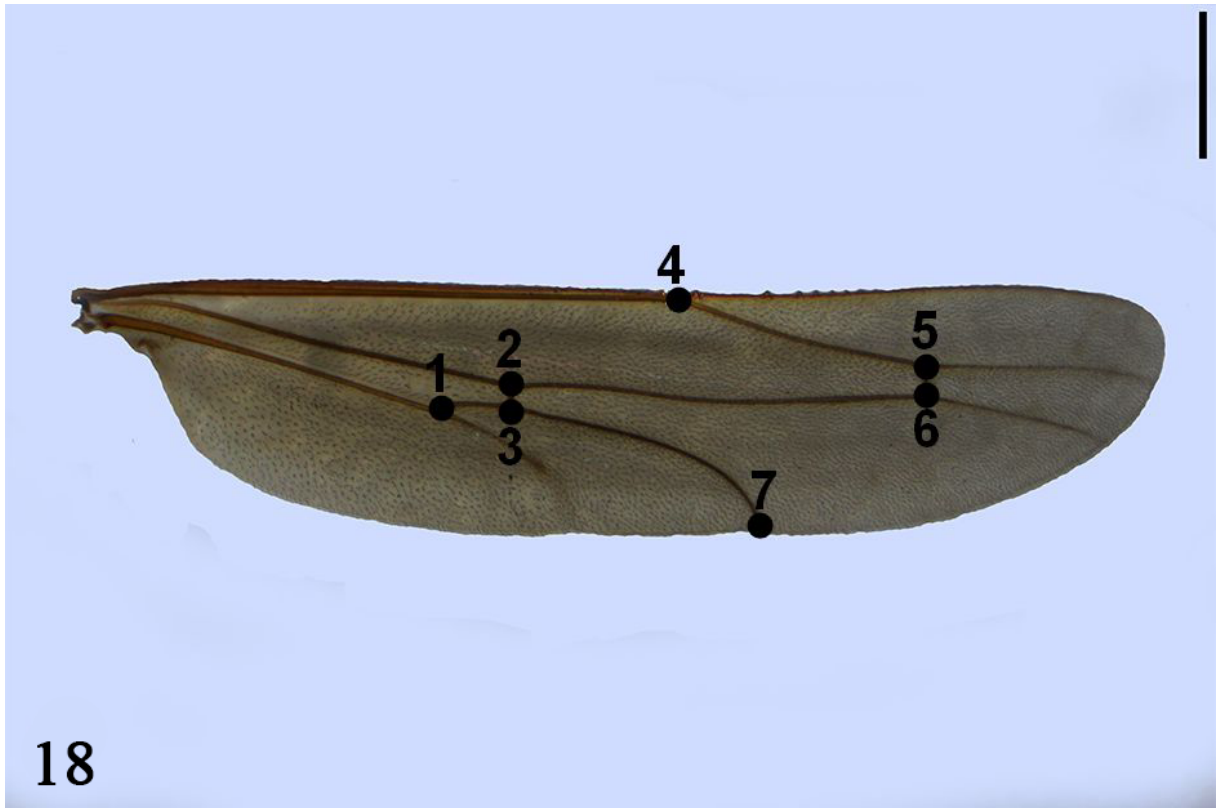
Figuras 16 e 17 – Padrão estabelecido para a obtenção das imagens da asa anterior. Os círculos representam os marcos anatômicos delimitados para esta região, os números correspondem a sequência de estabelecimento dos marcos. Barra de escala = 1mm.



17

Fonte: Do autor (2020).

Figuras 18 e 19 – Padrão estabelecido para a obtenção das imagens da asa posterior. Os círculos representam os marcos anatômicos delimitados para esta estrutura, os números correspondem a sequência de estabelecimento dos marcos. Barra de escala = 1mm.



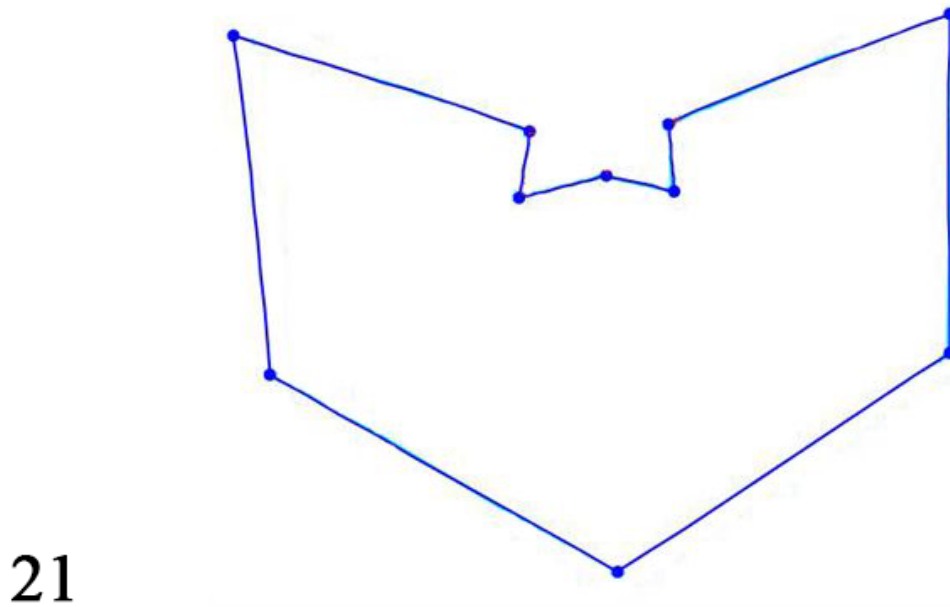
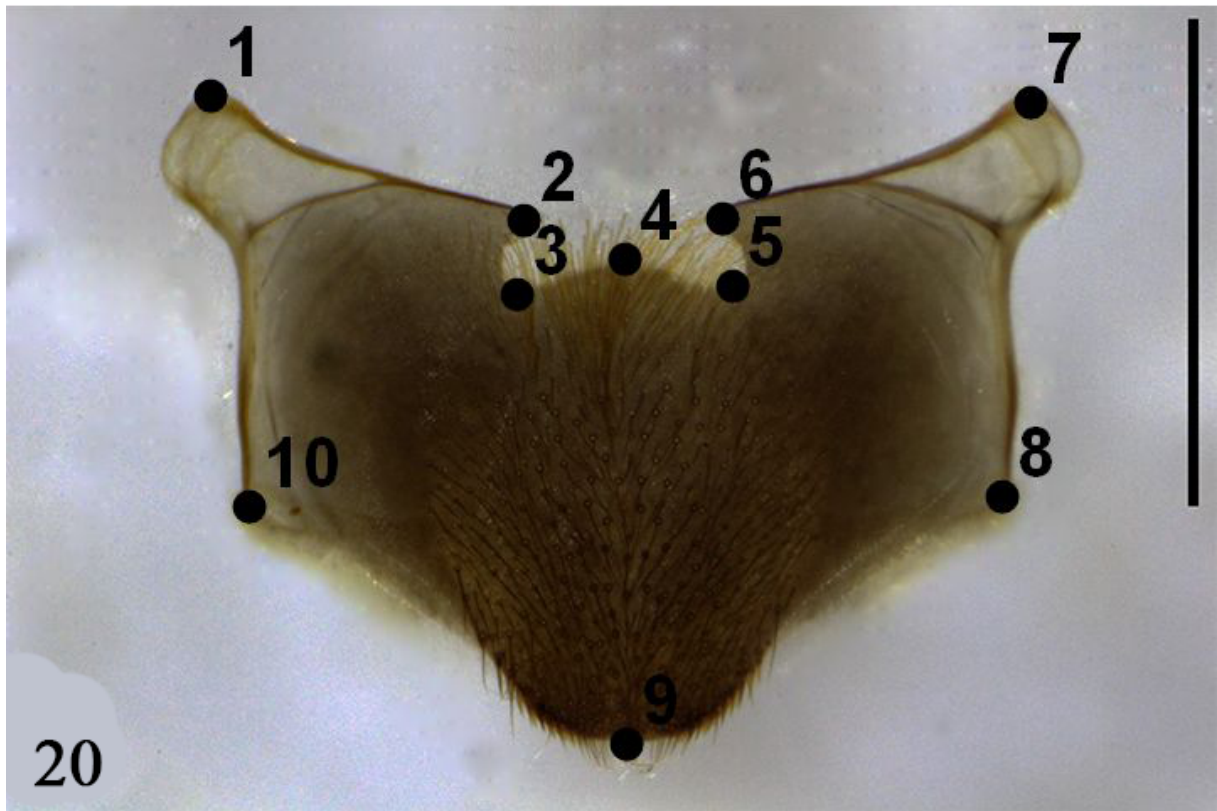
Fonte: Do autor (2020).

### 5.3.3 Obtenção dos marcos anatômicos no metassoma

Nesta região foi escolhido para o estabelecimento dos marcos anatômicos o último esterno metassomal (esterno VI). Esta estrutura já foi analisada em estudos anteriores com

vespas da tribo Polistini, apresentado resultados positivos para a diferenciação de castas em algumas espécies (DAPPORTO; PETROCELLI; TURILLAZZI, 2011). A estrutura foi retirada do restante do metassoma durante o processo de dissecação do metassoma para a análise do desenvolvimento do ovário, o esterno VI foi colocado em uma lâmina e planificada com o auxílio de uma lamínula. Os marcos anatômicos foram estabelecidos seguindo o padrão utilizado por Petrocelli e Turillazzi (2013), com adaptações necessárias para morfologia encontrada em *M. cassununga*, os marcos estabelecidos para esta estrutura estão representados na Figura 20.

Figuras 20 e 21 – Padrão estabelecido para a obtenção das imagens do esterno 6. Os círculos representam os marcos anatômicos delimitados para esta estrutura, os números correspondem a sequência de estabelecimento dos marcos. Barra de escala = 1mm.



Fonte: Do autor (2020).

Todas as imagens obtidas durante esta etapa foram armazenadas em um diretório específico de acordo com a estrutura analisada (clípeo, asa anterior, asa posterior e esterno metassomal VI). Com o auxílio do software TpsUtil v. 1.60 foi criado um arquivo com as informações de todas as imagens no formato de. tps. Posteriormente foi realizada a demarcação

dos marcos anatômicos com o programa TpsDig2 v. 2.19. Como resultado desta etapa foi criado um arquivo de texto (.txt) com todas as coordenadas cartesianas de todos os marcos anatômicos.

#### **5.4 Análises morfométricas**

Após da digitalização dos marcos anatômicos e aquisição dos dados de cada ponto, a sobreposição ou superimposição dos marcos é o processo que gera as variáveis que serão analisadas estatisticamente. O método de sobreposição utilizado foi a Análise Generalizada de Procrustes (AGP) que realiza a otimização via método de quadrados mínimos para os parâmetros de translocação e rotação (ADAMS; ROHLF; SLICE, 2004).

Esta etapa tem o objetivo de remover os efeitos de posição, tamanho, e orientação, permanecendo apenas as informações de forma. Como resultado da técnica de superimposição foi gerada uma variável de tamanho que recebe o nome de tamanho de centroide (TC) e variáveis de forma (resíduos de sobreposição) que são as variações que se mantêm estáveis independentemente das variações de tamanho (MONTEIRO; REIS, 1999).

Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) utilizando as variações encontradas pela AGP para explorar as variações encontradas, e se essas variações demonstravam indícios de diferenciação morfológica entre as castas. A distribuição dos indivíduos na PCA em todas as estruturas foi definida pelos dois componentes principais que apresentaram maior variação entre as castas.

Para as análises seguintes o efeito de alometria foi corrigido nas estruturas utilizando uma regressão. Nesta análise foi utilizada a configuração anatômica de cada estrutura analisada como variável dependente, e como variável preditora foi utilizado o tamanho do centroide. Como resultado desta análise foi possível encontrar variações nas estruturas que correspondem somente a alterações na forma.

As variações de forma encontradas em cada estrutura foram analisadas por meio de análise discriminante (DA) com teste de validação cruzada (VC), e uma análise de covariância canônica (CVA), todos os valores de p foram obtidos por meio do teste de permutação contra hipótese nula de independência. A DA e CVA foram realizadas para testar a presença de separação de grupos com relação a casta dos indivíduos. Todas as análises utilizadas foram realizadas com auxílio do software MorphoJ v. 2.0 (KLINGENBERG, 2010).

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 6.1 Determinação de castas

Diante dos critérios estabelecidos, as castas foram determinadas para todos os indivíduos analisados. Os critérios que foram utilizados em cada ninho e o número de indivíduos em cada casta estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Critérios utilizados na determinação das castas em cada ninho analisado. As colunas representam os ninhos que foram analisados, o número de indivíduos identificados em cada casta, e os critérios utilizados para a determinação das castas. Os critérios foram estabelecidos baseando-se nas análises morfofisiológicas: DO: desenvolvimento ovariano; IR: idade relativa e DA: desgaste alar. No total foram determinadas 27 fêmeas como rainhas e 75 fêmeas como operárias.

Ninho	Rainha	Operária(s)	Critérios		
			DO	IR	DA
Ninho 1	1	6	X	X	
Ninho 2	1	1	X	X	
Ninho 3	1	2	X	X	
Ninho 4	1	3	X	X	
Ninho 5	1	10	X	X	X
Ninho 6	1	9	X	X	X
Ninho 7	1	2	X	X	
Ninho 8	1	5	X	X	
Ninho 9	1	7	X	X	
Ninho 10	1	1	X	X	
Ninho 11	1	7	X	X	
Ninho 12	1	1	X	X	
Ninho 13	1	5	X	X	
Ninho 14	1	5	X	X	
Ninho 15	1	1	X	X	
Ninho 16	1	0	X	X	
Ninho 17	1	1	X	X	
Ninho 18	1	0	X	X	
Ninho 19	1	2	X	X	X
Ninho 20	1	0	X	X	
Ninho 21	1	1	X	X	
Ninho 22	1	1	X	X	
Ninho 23	1	0	X	X	
Ninho 24	1	1	X	X	
Ninho 25	1	3	X	X	X
Ninho 26	1	0	X	X	
Ninho 27	1	0	X	X	

Fonte: Do autor (2020).

### 6.1.1 Desenvolvimento ovariano

Ovários não desenvolvidos foram observados em 38 fêmeas, já ovários desenvolvidos foram observados em 64 indivíduos, sendo que 20 deles apresentavam ovários muito desenvolvidos. Foi encontrado mais de uma fêmea com ovários desenvolvidos em 15 ninhos. Onze dos ninhos analisados apresentaram apenas uma fêmea com ovários desenvolvidos, sendo que em seis deles apenas um indivíduo estava presente no momento da coleta. Foi selecionada como rainha a fêmea que apresentava maior grau de desenvolvimento ovariano entre os indivíduos presentes no ninho. Nos ninhos em que foram encontradas apenas uma fêmea, essa foi considerada rainha.

A presença de mais de uma fêmea com condições reprodutivas ideais já foi relatada em espécies da tribos Polistini (ISHIKAWA et al., 2010; JUDD et al., 2015), Epiponini (NOLL et al., 2009; KAPHEIM, 2017), Ropalidiini (HENSHAW; STRASSMANN; QUELLER, 2000), e Mischocyttarini (NODA, 2005; CUNHA et al., 2017; CECÍLIO; ROCHA; GIANNOTTI, 2014). As condições de desenvolvimento ovarino observadas em *M. cassununga* nas análises morfofisiológicas do presente estudo já foram relatadas em estudos anteriores para a mesma espécie (MURAKAMI; SHIMA; DESUÓ, 2009; BIAGIOTTO; SHIMA, 2017).

A rainha em vespas sociais passa maior parte do tempo no ninho e tem acesso a maior quantidade de recursos, tanto trazidos por outros indivíduos adultos, quanto aos obtidos por meio de solicitação de saliva larval, possuindo uma maior probabilidade de desenvolvimento dos ovários (HUNT; BAKER; BAKER, 1982; HUNT 1988; O'DONNELL 1998; JUDD; MAGNUS; FASNACHT, 2010). A alimentação trazida ao ninho por operárias é consumida em grande parte pelas fêmeas de maior posição hierárquica na colônia, o que é uma provável explicação para as diferenças de desenvolvimento ovariano encontrada entre as rainhas e operárias nas análises realizadas (O'DONNELL et al., 2018).

As condições para o desenvolvimento ovariano apresentam variações de acordo com o ciclo colonial e as características da colônia (TORRES et al., 2009). O número de fêmeas que apresentavam ovários desenvolvidos foi maior em ninhos que apresentavam um número maior de operárias, corroborando estudos anteriores que constatam que a disponibilidade de recursos está diretamente relacionada ao número de indivíduos forrageando, levando a um número maior de fêmeas com ovários desenvolvidos em ninhos com um número maior de operárias (ISHIKAWA et al., 2010; BIAGIOTTO; SHIMA, 2017).



### 6.1.2 Idade relativa

O padrão de pigmentação do esterno metassomal III foi observado em todas as 102 fêmeas, sendo 47 classificadas como velhas e 55 como jovens. Este critério foi utilizado na determinação das castas em 25 ninhos (TABELA 1), com as rainhas sendo identificadas como os indivíduos com maior idade relativa na colônia, conforme a correlação do padrão de pigmentação e idade relativa demonstrado para *M. cassununga* por Murakami (2012) (FIGURAS 6–9).

Estudos com *M. cassununga* demonstram que rainha é a fêmea mais velha presente no ninho, apresentando comportamentos de dominância. Entretanto, comportamentos agressivos são raros nesta espécie, sendo o mais comum o contato entre os indivíduos por meio da antena (PREZOTO et al., 2004; MURAKAMI, 2012). O fato de a fêmea mais velha ocupar posição hierárquica superior em *M. cassununga* provavelmente está relacionada com a monoginia e a linearidade hierárquica encontrada durante toda a ontogenia colonial (PREZZOTO et al., 2004; PENNA, 2007).

A presença de apenas uma fêmea monopolizando a atividade reprodutiva e realizando majoritariamente tarefas intranidais favorece fêmeas mais velhas a apresentarem condições fisiológicas ideais para desempenhar funções reprodutivas nesta espécie, visto que elas evitam tarefas de alto custo energético e tem acesso a alimentos mais ricos em nutrientes (O'DONNELL, 1998).

### 6.1.3 Desgaste alar

Foram examinadas no total 81 fêmeas que apresentaram asas sem desgaste, 17 que apresentaram asas com pouco desgaste e 4 que apresentaram asas com muito desgaste. Este critério foi utilizado na determinação das castas em 4 ninhos (TABELA 1). Nestes ninhos os indivíduos apresentavam idade relativa e desenvolvimento dos ovários semelhantes. Assim, foram classificados como rainhas os que possuíam menor desgaste alar.

Galeano (2010) demonstra que indivíduos velhos em espécies que apresentam alto nível de conflitos hierárquicos podem apresentar maior desgaste alar que os mais jovens devido as interações entre os indivíduos durante tais conflitos. A presença de indivíduos que apresentavam algum nível de desgaste alar foi baixa em *M. cassununga*, condição que pode ser resultado da ausência de conflitos agonísticos entre os indivíduos, já que operárias evitam contato direto com a rainha (MURAKAMI, 2012).

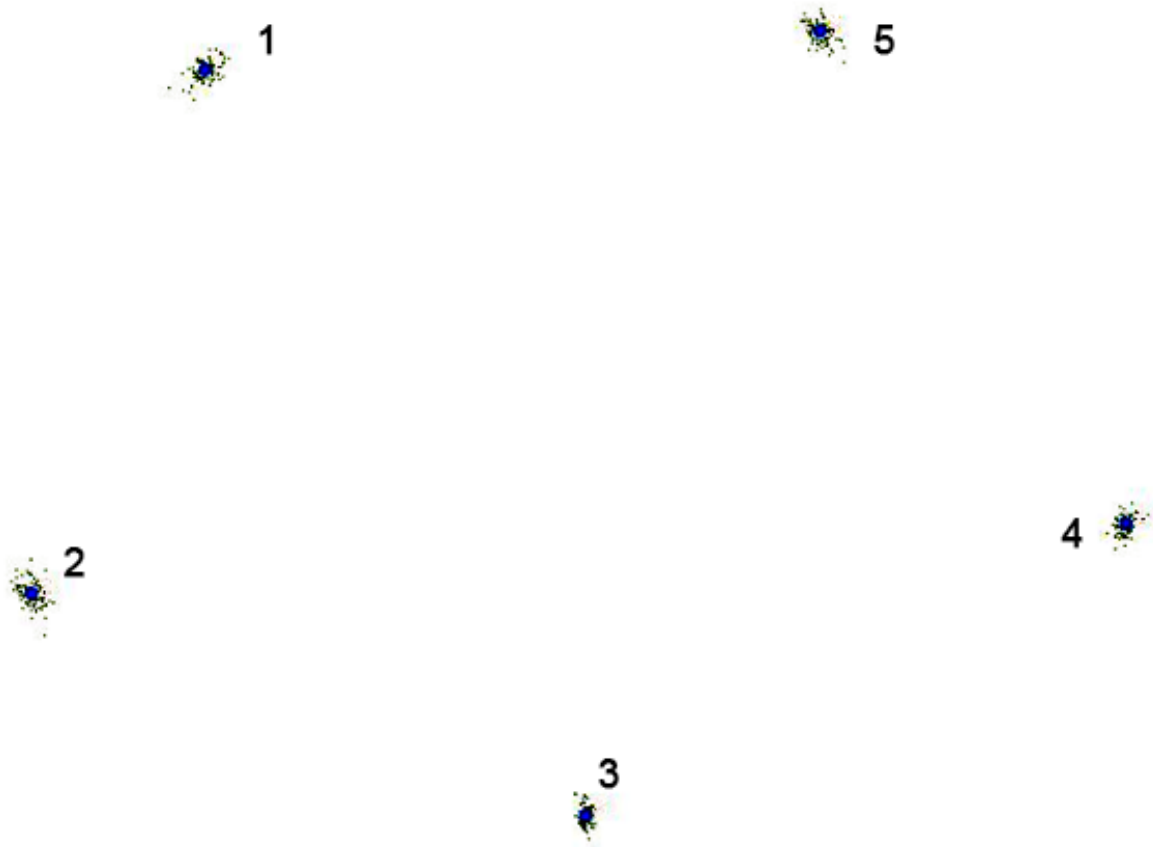
O desgaste alar encontrado nos indivíduos foi atribuído aos hábitos de forrageamento desempenhados majoritariamente pelas operárias. Em *M. cassununga* as rainhas podem forragear durante os períodos de fundação da colônia até a emergência dos primeiros adultos, depois toda essa atividade é desempenhada pelas operárias (CASTRO; GUIMARÃES; PREZOTO, 2011). Por isto no presente estudo, as fêmeas com maior desgaste alar foram consideradas operárias.

## **6.2 Análises morfométricas**

### **6.2.1 Clípeo**

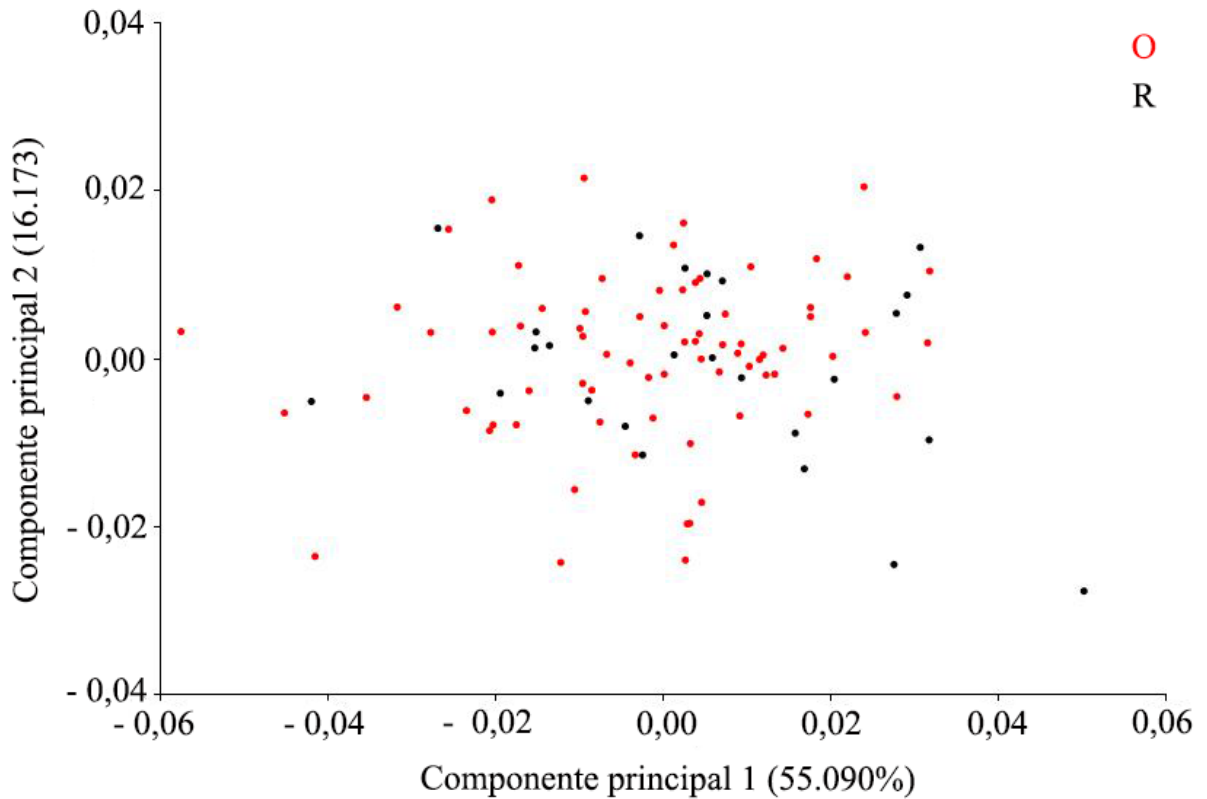
Foram analisadas imagens do clípeo de 100 fêmeas, sendo realizada a superimposição de Procrustes (representada na Figura 22). A análise de componentes principais (PCA) resultou em uma variância de 55.090% para o primeiro componente e 16.173% para o segundo componente. Os resultados da PCA estão sumarizados na Figura 23.

Figura 22 – Análise de superimposição de Procrustes utilizando os marcos anatômicos obtidos para o clípeo. Os círculos azuis representam a configuração consenso encontrada para cada marco, os pontos pretos representam as variações em cada marco anatômico.



Fonte: Do autor (2020).

Figura 23 – Análise de componentes principais (PCA) com as variações encontrada nos marcos anatômicos do clipeo após a superimposição de Procrustes. Os pontos vermelhos correspondem as operárias (O) e os pontos pretos (R) correspondem as rainhas.

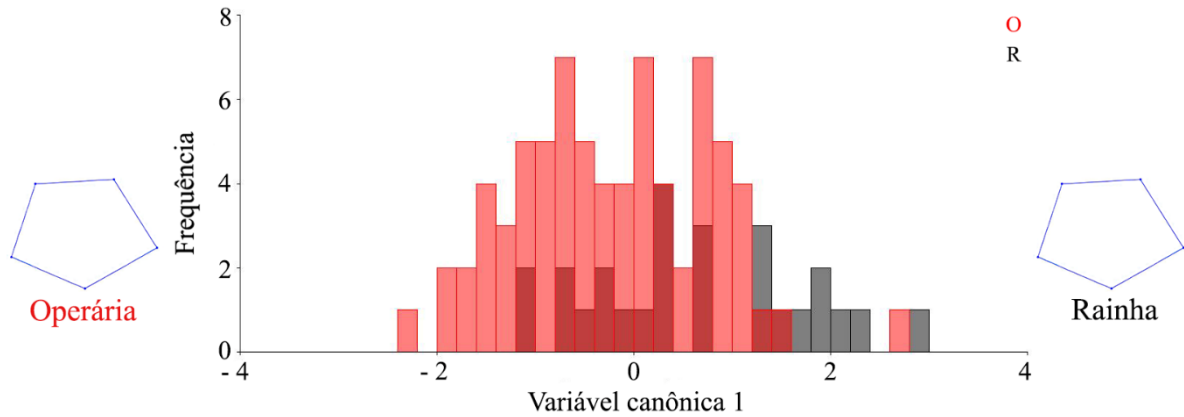


Fonte: Do autor (2020).

A regressão para análise de efeitos de alometria retornou um índice de soma dos quadrados de 0,06281385. Desse total, 0,00464814 (7,3999%) foi atribuído a variações no tamanho do centroide e 0,05816571 (92,6001%) foi atribuído a resíduos da regressão variando independentemente do tamanho do centroide. O teste de permutação contra hipótese nula de independência apontou p-valor = 0,0006, demonstrando resultado significativo (p-valor 0,05).

A análise de covariância canônica (CVA) para o clipeo indicou a distância de Mahalanobis entre as castas de 0,8552, com p-valor de 0,0544. Os resultados estão demonstrados na Figura 24. A análise discriminante e o teste de validação cruzada realizados par a par para o clipeo estão expostos na Tabela 2.

Figura 24 – Análise de covariância canônica realizada para o clipeo após correção para os efeitos de alometria. Operárias (O) são representadas pelas colunas vermelhas (esquerda) e rainhas (R) pelas colunas cinzas (direita). As representações gráficas da forma do clipeo de rainhas e operárias estão indicadas nas extremidades laterais do gráfico.



Fonte: Do autor (2020).

Tabela 2 – Sumarização das análises discriminantes (DA) e validação cruzada (VC) para o clipeo. As linhas indicam a casta a qual pertenciam os espécimes analisados, e as colunas indicam os grupos (rainha e operária) aos quais os espécimes foram atribuídos.

	DA		VC	
	Operária	Rainha	Operária	Rainha
<b>Operária</b>	49 (66.21%)	25 (33.78%)	45 (60.81%)	29 (39.18%)
<b>Rainha</b>	9 (34.61%)	17 (65.38%)	12 (46.15%)	14 (53.84%)

Fonte: Do autor (2020).

A análise de componentes principais não demonstrou indícios de separação de grupos com relação as castas operárias e rainhas considerando as diferenças encontradas no clipeo. As análises discriminantes não demonstraram a presença de dois grupos e a porcentagem de reclassificação correta foi baixa (TABELA 2), evidenciando que a análise não foi bem-sucedida em separar castas por meio das diferenças morfológicas de forma encontradas no clipeo. A CVA também não demonstrou resultado significativo para a separação de castas nesta estrutura (p-valor = 0.05).

A maioria dos estudos que utilizam o clipeo como ferramenta para diferenciação de castas com técnicas de morfometria geométrica utilizam espécies com determinação de castas bem definidas, existindo ainda pouco estudos com vespas sociais (KANDEMIR; OZKAN; FUCHS, 2011). De Souza (2015) afirma que em *Apis mellifera* diferenças morfológicas entre castas podem ser encontradas por meio de morfometria geométrica analisando regiões

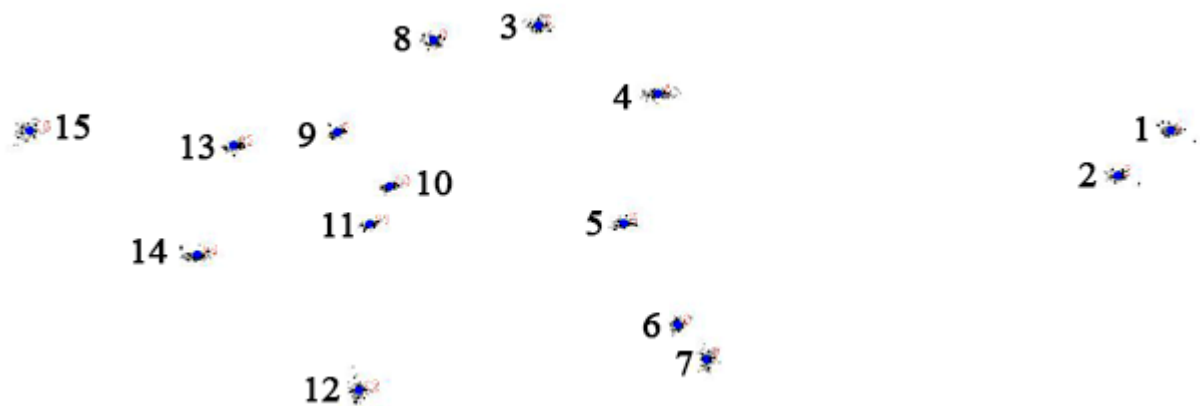
cefálicas, evidenciando a importância desta região em estudos de diferenciação morfológica entre castas.

Análises morfométricas com vespas sociais demonstram que as castas podem apresentar diferenças com relação ao tamanho e a forma de regiões cefálicas e que essas diferenças poderiam sugerir determinação pré-imaginal de castas nestes grupos, como ocorre em vespas da tribo Epiponini (JONES et al., 2009; DESUÓ, 2013). A mesma diferenciação entre as operárias e a rainha com relação a componentes cefálicos não foi encontrada para *M. cassununga* no presente estudo, sugerindo que a influência de fatores pré-imaginiais pode não representar um fator decisivo na determinação de castas nesta espécie (NODA; SILVA; GIANNOTTI, 2001; NODA, 2005; ROCHA; GIANNOTTI, 2016).

### 6.2.2 Asas anteriores e posteriores

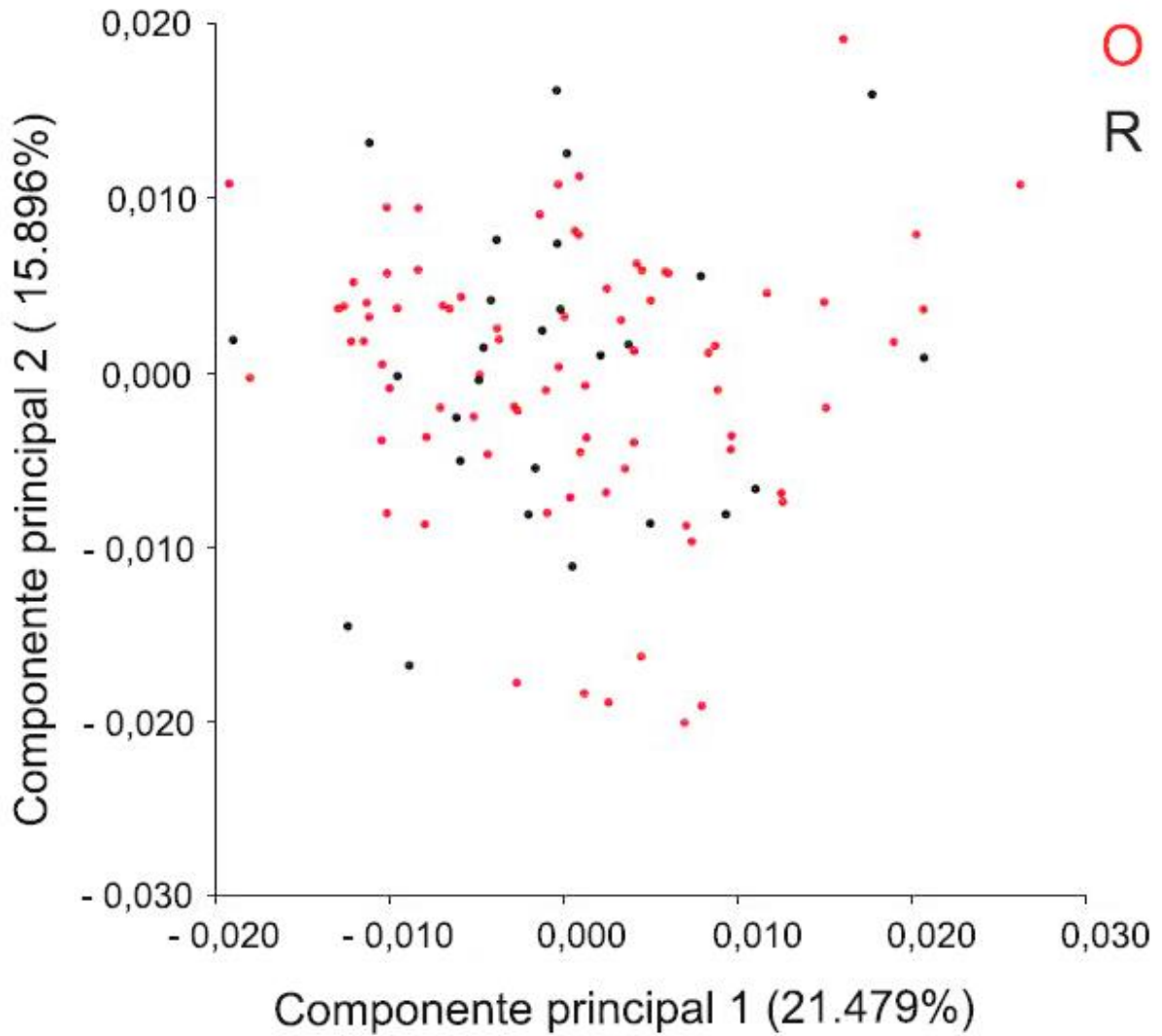
Foram analisadas 102 asas anteriores das fêmeas por meio da superimposição de Procrustes (representada na Figura 25). A análise de componentes principais (PCA) apresentou uma variância de 21.479% para o primeiro componente e 15.896% para o segundo componente (FIGURA 26). O mesmo número de asas posteriores foi analisado, sendo que após a superimposição de Procrustes (representada na Figura 27), a Análise de Componentes Principais (PCA) apresentou uma variância de 40.060% para o primeiro componente e 27.274% para o segundo componente (FIGURA 28).

Figura 25 – Análise de superimposição de Procrustes utilizando os marcos anatômicos obtidos para a asa anterior. Os círculos azuis representam a configuração consenso encontrada para cada marco, os pontos pretos representam as variações em cada marco anatômico.



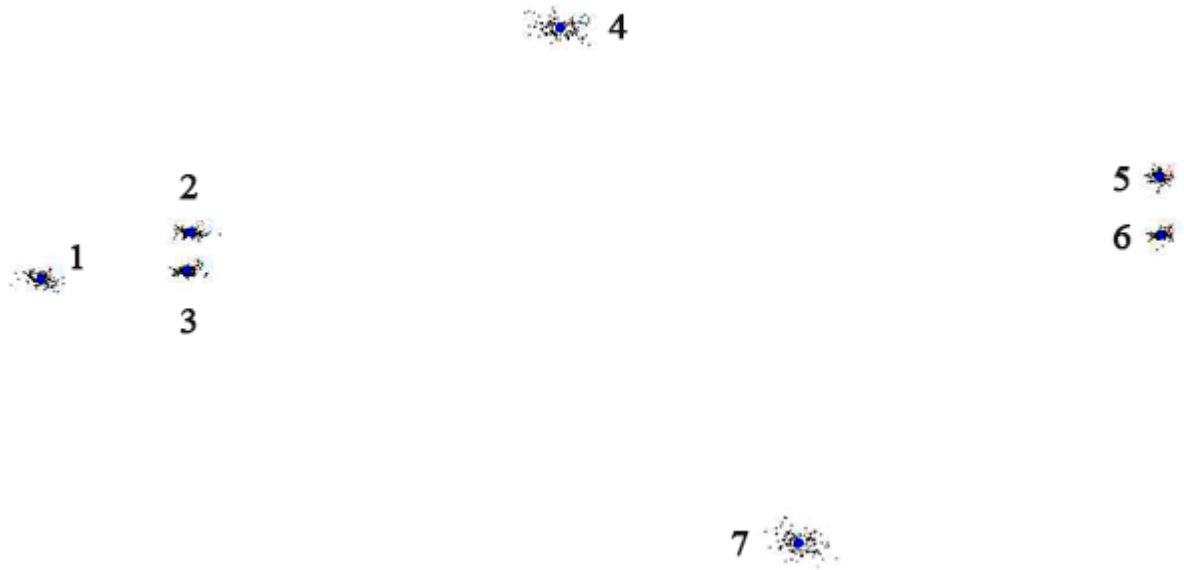
Fonte: Do autor (2020).

Figura 26 – Análise de componentes principais (PCA) com as variações encontrada nos marcos anatômicos da asa anterior após a superimposição de Procrustes. Os pontos vermelhos correspondem as operárias (O) e os pontos pretos (R) correspondem as rainhas.



Fonte: Do autor (2020).

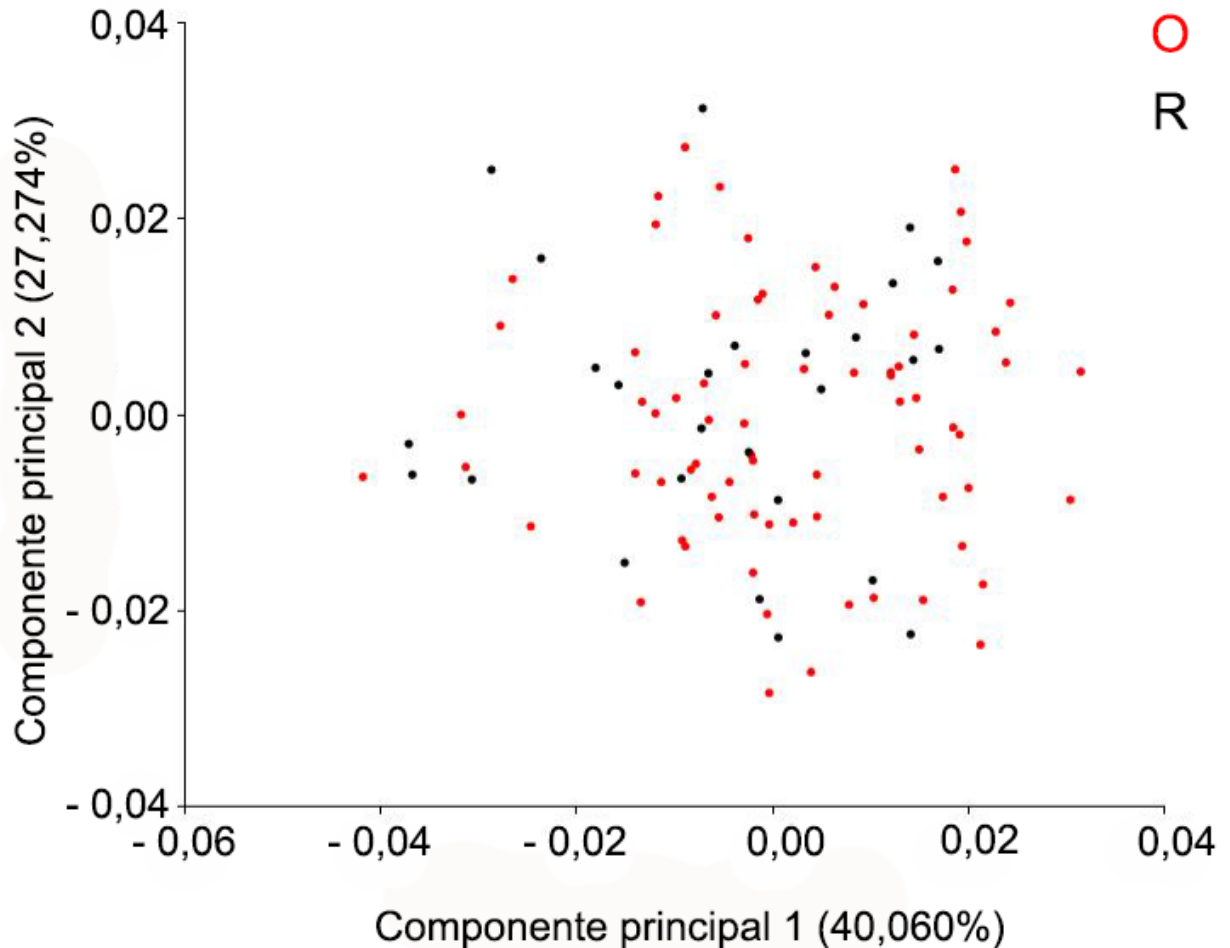
Figura 27 – Análise de superimposição de Procrustes utilizando os marcos anatômicos obtidos para a asa posterior. Os círculos azuis representam a configuração consenso encontrada para cada marco, os pontos pretos representam as variações em cada marco anatômico.



Fonte: Do autor (2020).



Figura 28 – Análise de componentes principais (PCA) com as variações encontrada nos marcos anatômicos da asa posterior após a superimposição de Procrustes. Os pontos vermelhos correspondem as operárias (O) e os pontos pretos (R) correspondem as rainhas.



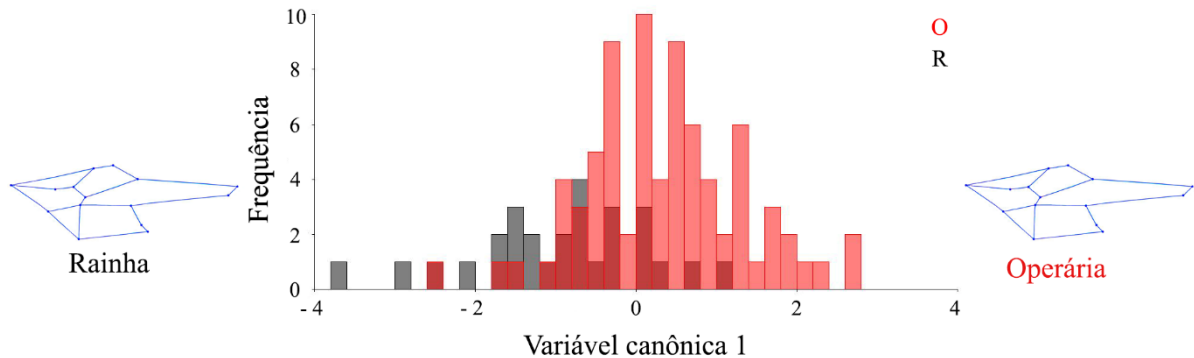
Fonte: Do autor (2020).

A regressão para análise de efeitos de alometria para a asa anterior retornou um índice de soma dos quadrados de 0.10077376. Desse total, 0.00301807 (2.9949%) foi atribuído a variações no tamanho do centroide e 0.09775569 (97.0051%) a resíduos da regressão variando independentemente do tamanho do centroide. O teste de permutação contra hipótese nula de independência apontou  $p$ -valor = 0.0341, demonstrando resultado significativo ( $p$ -valor 0.05). Já a regressão para análise de efeitos de alometria para a asa posterior retornou um índice de soma dos quadrados de 0.06320604. Desse total, 0.00439377 (6.9515%) foi atribuído a variação no tamanho do centroide e 0.05881227 (93.0485%) a resíduos de regressão. O teste de permutação contra hipótese nula de independência apontou  $p$ -valor < 0.0001, demonstrando resultado significativo ( $p$ -valor 0.05).

A análise de covariância canônica (CVA) para a asa anterior indicou a distância de Mahalanobis entre as castas de 1.2964, com  $p$ -valor de 0.0863 (FIGURA 29). A mesma análise

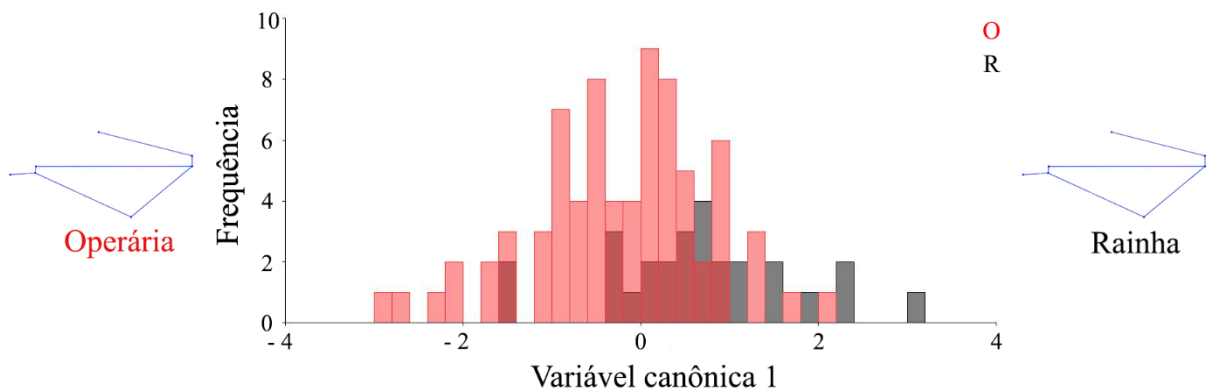
para a asa posterior indicou a distância de Mahalanobis de 0,9000, com p-valor de 0,0873 (FIGURA 30).

Figura 29 – Análise de covariância canônica realizada para a asa anterior após correção para os efeitos de alometria. Operárias (O) são representadas pelas colunas vermelhas (esquerda) e rainhas (R) pelas colunas cinzas (direita). As representações gráficas da forma da asa anterior de rainhas e operárias estão indicadas nas extremidades laterais do gráfico.



Fonte: Do autor (2020).

Figura 30 – Análise de covariância canônica realizada para a asa posterior após correção para os efeitos de alometria. Operárias (O) são representadas pelas colunas vermelhas (esquerda) e rainhas (R) pelas colunas cinzas (direita). As representações gráficas da forma da asa posterior de rainhas e operárias estão indicadas nas extremidades laterais do gráfico.



Fonte: Do autor (2020).

As análises discriminantes e o teste de validação cruzada realizados par a par para a asa anterior estão expostos na Tabela 03. Os resultados das mesmas análises realizadas para a asa posterior estão demonstrados Tabela 04. A porcentagem de reclassificação correta das castas na análise discriminante foi baixa tanto para a asa anterior, quanto para a asa posterior.

Tabela 3 – Sumarização das análises discriminantes (DA) e de validação cruzada (VC). As linhas indicam a casta a qual pertenciam os espécimes analisados, e as colunas indicam os grupos (rainha e operária) aos quais os espécimes foram atribuídos.

	DA		VC	
	Operária	Rainha	Operária	Rainha
Operária	57 (73.07%)	21 (26.92%)	46 (58.97%)	32 (41.02%)
Rainha	9 (32.14%)	19 (67.85%)	17 (60.71%)	11 (39.28%)

Fonte: Do autor (2020).

Tabela 4 – Sumarização das análises discriminantes (DA) e validação cruzada (VC) para as asas posteriores. As linhas indicam a casta a qual pertenciam os espécimes analisados, e as colunas indicam os grupos (rainha e operária) aos quais os espécimes foram atribuídos.

	DA		VC	
	Operária	Rainha	Operária	Rainha
Operária	49 (65.33%)	26 (34.66%)	43 (57.33%)	32 (42.66%)
Rainha	8 (29.62%)	19 (70.37%)	14 (51.85%)	13 (48.14%)

Fonte: Do autor (2020).

As análises de componentes principais não demonstraram indícios de separação de grupos com relação as castas operárias e rainhas considerando a asa anterior direita e posterior direita. As análises discriminantes não demonstraram a presença de dois grupos e a porcentagem de reclassificação correta foi baixa (TABELAS 3 e 4), evidenciando que a análise não foi bem-sucedida em separar castas por meio das diferenças morfológicas de forma encontradas em ambas as asas (anteriores e posteriores). A CVA também não demonstrou resultado significativo para a separação de castas para essas estruturas ( $p$ -valor = 0.05).

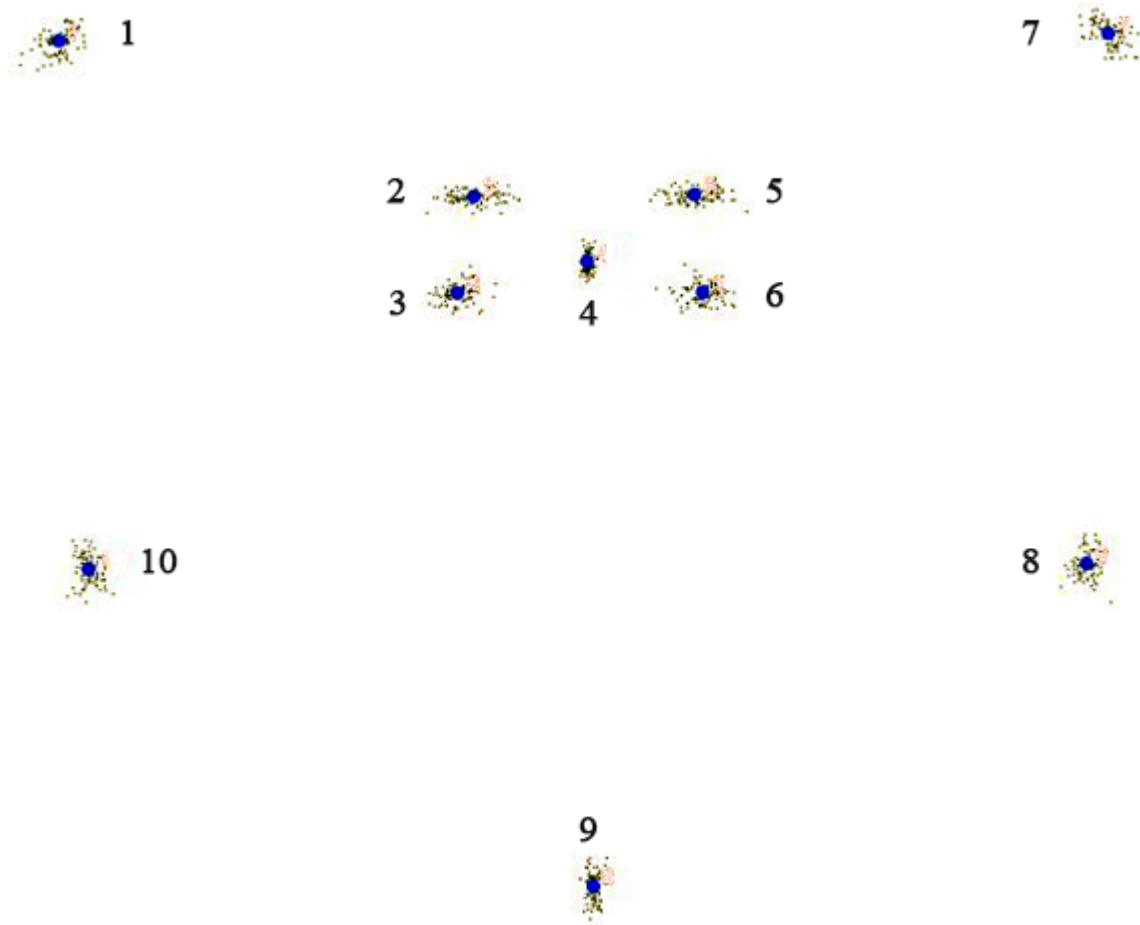
As asas anteriores e posteriores são as estruturas mais utilizadas em trabalhos com morfometria geométrica em insetos, devido ao padrão marcante de venação alar que facilita a obtenção dos marcos anatômicos (DEVICARI; LOPES; SUESDEK, 2011; MACEDO, 2016). Perrard, Lopez-Osorio e Carpenter (2016) demonstraram a eficiência do estudo da forma da asa anterior por meio de técnicas de morfometria geométrica para ajudar a elucidar as relações filogenéticas em vespas sociais.

Perrard et al. (2012) evidenciaram a diferença na forma das asas entre castas em três espécies de vespas sociais, associando esta condição a fatores pré-imaginais, como diferenças de qualidade e quantidade de nutrientes durante o desenvolvimento. Esta diferenciação com relação a forma das asas não foi demonstrada para *M. cassununga*, reforçando a provável ausência de determinação pré-imaginal de castas nesta espécie ao contrário dos resultados apresentados por Perrard et al. (2012).

### 6.2.3 Esterno metassomal VI

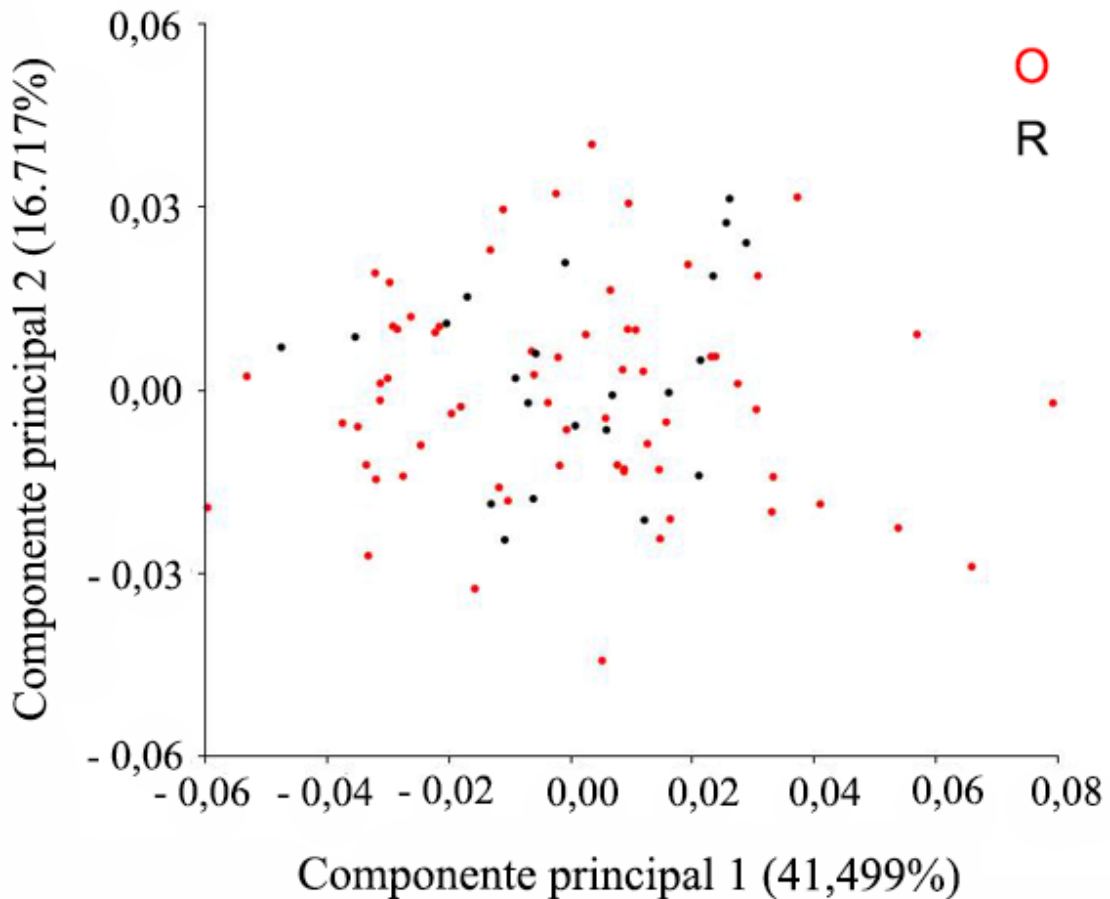
Foram analisadas imagens do esterno metassomal VI de 94 fêmeas. Após a superimposição de procrustes (representada na Figura 31), a Análise de Componentes Principais (PCA) resultou em uma variância de 41.499% para o primeiro componente e 16.717% para o segundo componente. Os resultados da PCA estão representados na Figura 32.

Figura 31 – Análise de superimposição de Procrustes utilizando os marcos anatômicos obtidos para o esterno metassomal VI. Os círculos azuis representam a configuração consenso encontrada para cada marco, os pontos pretos representam as variações em cada marco anatômico.



Fonte: Do autor (2020).

Figura 32 – Análise de componentes principais (PCA) com as variações encontrada nos marcos anatômicos do esterno metassomal VI após a superimposição de Procrustes. Os pontos vermelhos correspondem as operárias (O) e os pontos pretos (R) correspondem as rainhas.

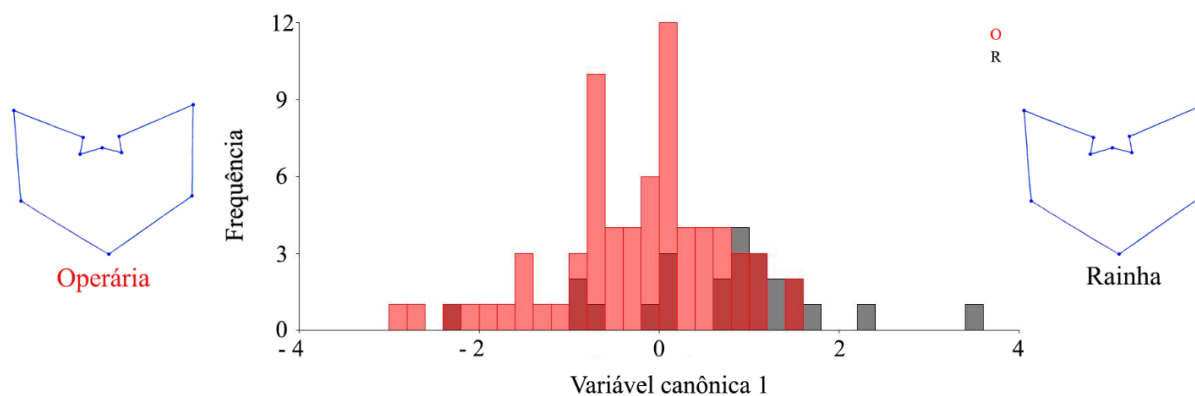


Fonte: Do autor (2020).

A regressão para análise de efeitos de alometria retornou um índice de soma dos quadrados de 1.72457731. Desse total, 1.08571013 (62.9551%), foi atribuído a variações no tamanho do centroide e 0.63886717 (37.0449) foi atribuído a resíduos da regressão variando independentemente do tamanho do centroide. O teste de permutação contra hipótese nula de independência apontou  $p$ -valor  $< 0.0001$ , demonstrando resultado significativo ( $p$ -valor 0.05).

A análise de covariância canônica (CVA) para o esterno metassomal VI indicou a distância de Mahalanobis entre as castas de 0.9559, com  $p$ -valor de 0.4359. O resultado desta análise está demonstrado na Figura 33. A análise discriminante e o teste de validação cruzada realizados par a par para o esterno 6 estão representados na Tabela 5.

Figura 33 – Análise de covariância canônica realizada para o esterno metassomal VI após correção para os efeitos de alometria. Operárias (O) são representadas pelas colunas vermelhas (esquerda) e rainhas (R) pelas colunas cinzas (direita). As representações gráficas da forma do esterno metassomal VI de rainhas e operárias estão indicadas nas extremidades laterais do gráfico.



Fonte: Do autor (2020).

Tabela 5 – Resultados das análises discriminantes (DA) e validação cruzada (VC). As linhas indicam a casta a qual pertenciam os espécimes analisados, e as colunas indicam os grupos (rainha e operária) aos quais os espécimes foram atribuídos.

	DA		VC	
	Operária	Rainha	Operária	Rainha
Operária	50 (71.42%)	20 (28.57%)	36 (51.42%)	34 (48.57%)
Rainha	8 (33.33%)	16 (66.66%)	11 (45.83%)	13 (54.16%)

Fonte: Do autor (2020).

A análise de componentes principais (PCA) não demonstrou indícios de separação de grupos com relação as castas operárias e rainhas. A análise discriminante não demonstrou resultados significativos para a diferenciação entre castas com relação a forma do esterno metassomal VI e a porcentagem de reclassificação correta dos indivíduos com relação aos grupos (rainha e operária) foi baixa (TABELA 5). A CVA também não demonstrou resultado significativo para a separação de castas para esta estrutura (p-valor = 0.05).

As fêmeas das famílias Vespinae e Polistinae possuem no metassoma uma rede de ductos ligados ao órgão de Van Der Vetch. – Estes ductos se abrem na região anterior do esterno metassomal VI e produzem compostos químicos importantes na defesa do ninho (Turillazzi, 1979). Em espécies de vespas monogínicas, a rainha pode exercer sozinha as funções de defesa do ninho. Portanto, seria provável um esterno mais desenvolvido nas rainhas correlacionado com a maior função secretora do órgão de Van Der Vetch (LONDON; JEANNE, 2000). Porém os resultados do presente estudo não demonstram uma diferenciação na forma do esterno metassomal VI em *M. cassununga*.

Estudos recentes valendo-se de morfometria geométrica em vespas sociais sugerem a existência de diferenciação pré-imaginal em algumas espécies. Dapporto, Petrocelli e Turillazzi (2011) sugerem que a determinação de castas em *Polistes gallicus* é pré-imaginal, promovendo diferenciação morfológica em regiões metassomais. Petrocelli e Turillazzi (2013) também encontrou diferenciação na forma desta estrutura em *Polistes associus* e *Polistes biglumis* utilizando morfometria geométrica, porém *Polistes dominula* e *Polistes nimphus* não demonstraram os mesmos resultados. Assim, a condição monogínica, como a encontrada em *M. cassununga*, pode não ser um critério determinante para o surgimento de castas com diferenças morfológicas em vespas sociais.

Noda (2005) não encontrou evidências de diferenciação morfológica entre castas em *M. drewseni*, destacando a importância de fatores pós-imaginais na determinação de castas neste grupo. Oliveira (2007) também demonstra o mesmo resultado para *M. montei* com relação a diferenciação de castas. Os resultados encontrados nestas espécies e em estudos com *M. cassununga* sugerem que a ausência de diferenciação morfológica na forma das estruturas entre as castas rainha e operária pode representar um padrão para vespas sociais da tribo Mischocyttarini, sinalizando que a determinação de castas neste grupo não ocorre antes da emergência dos adultos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresenta indícios que as castas (operárias/rainha) em *M. cassununga* não são determinadas pré-imaginalmente, devido à ausência de diferenças na forma das estruturas corporais analisadas. As estruturas corporais utilizadas neste estudo apesar de proporcionarem resultados positivos para a diferenciação entre castas em outras espécies de vespas sociais, não demonstraram indícios desta mesma condição em *M. cassununga*, reforçando a importância das interações entre os adultos no estabelecimento da hierarquia colônial nesta espécie.

Os hábitos comportamentais relatados nesta espécie, como monoginia e ausência de conflitos hierárquicos, sugerem que exista um mecanismo de determinação de castas. Porém, este fator pode estar relacionado com um reconhecimento químico eficiente entre os indivíduos e não a fatores pré-imaginais que poderiam produzir diferenças entre castas marcantes.

Os resultados apresentados para *M. cassununga* no presente estudo com relação a diferenciação morfológica entre as castas reforçam um padrão encontrado em grande parte dos

representantes da tribo Mischocyttarini, que é a ausência de diferenciação morfológica entre as castas (GADAGKAR, 1991). Existem outros fatores que podem influenciar na hierarquia da colônia, atuando em um nível maior que o tamanho e a forma corporal em algumas espécies, destacando a importância de estudos futuros sobre determinação de castas em vespas sociais envolvendo aspectos outros que não a morfologia.

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. **Italian Journal of Zoology**, v. 71, n. 1, p. 5-16, 2004.

ALBERTSON, R. C.; KOCHER, T. D. Genetic architecture sets limits on transgressive segregation in hybrid cichlid fishes. **Evolution**, v. 59, n. 3, p. 686-690, 2005.

ALVES, A. N. et al. Isolation and characterisation of microsatellite loci in the wasp *Mischocyttarus cassununga*. **Insectes sociaux**, v. 59, n. 4, p. 565-570, 2012.

BANK, S. et al. Transcriptome and target DNA enrichment sequence data provide new insights into the phylogeny of vespoid wasps (Hymenoptera: Aculeata: Vespidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 116, p. 213-226, 2017.

BIAGIOTTO, R. H.; SHIMA, S. N. Comparative Study of the Development of *Mischocyttarus cassununga* Von Ihering and *Mischocyttarus cerberus styx* Richards Colonies (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini). **EntomoBrasilis**, v. 10, n. 3, p. 170-177, 2017.

BLACKITH, R. E. An analysis of polymorphism in social wasps. **Insectes sociaux**, v. 5, n. 3, p. 263-272, 1958.

CARPENTER, J. M. The phylogenetic relationships and natural classification of the Vespoidea (Hymenoptera). **Systematic Entomology**, v. 7, n. 1, p. 11-38, 1982.

CARPENTER, J. M. Phylogenetic relationships and the origin of social behaviour in the Vespidae. **The social biology of wasps**, p. 7-32, 1991.

CARPENTER, J. M.; MARQUES, O. M. Contribuição ao Estudo dos Vespídeos do Brasil. Universidade Federal da Bahia, Departamento de Fitotecnia. **Série Publicações Digitais**, v. 3, 2001.



CARPENTER, J. M. Synonymy of the genus *Marimbonda* Richards, 1978, with *Leipomeles* Möbius, 1856 (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae), and a new key to the genera of paper wasps of the New World. **American Museum novitates**, v. 2004, n. 3465, p 1-16, 2004.

CASTRO, M. M. D.; GUIMARÃES, L. D.; PREZOTO, F. Influence of environmental factors on the foraging activity of *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v. 58, n. 1, p. 133, 2011.

CASTRO, M. M. de et al. Nesting substrata, colony success and productivity of the wasp *Mischocyttarus cassununga*. **Revista Brasileira de entomologia**, v. 58, n. 2, p. 168-172, 2014.

CECÍLIO, D. S. S.; DA ROCHA, A. A.; GIANNOTTI, E. Post-embryonic Development of *Mischocyttarus latior* (Fox) (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v. 62, n. 3, p. 446-449, 2015.

CECÍLIO, D. S. S.; DA ROCHA, A. A.; GIANNOTTI, E. Task division and Age Polyethism in colonies of *Mischocyttarus latior* social wasps (Fox) (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v. 63, n. 1, p. 712-719, 2016.

CHANDRASHEKARA, K.; GADAGKAR, R. Behavioural castes, dominance and division of labour in a primitively eusocial wasp. **Ethology**, v. 87, n. 3-4, p. 269-283, 1991.

CRESPI, B. J.; YANEGA, D. The definition of eusociality. **Behavioral Ecology**, v. 6, n. 1, p. 109-115, 1995.

DAPPORTO, L.; PETROCELLI, I.; TURILLAZZI, S. Incipient morphological castes in *Polistes gallicus* (Vespidae, Hymenoptera). **Zoomorphology**, v. 130, n. 3, p. 197-201, 2011.

DE CASTRO, M. M.; LEMOS GUIMARÃES, D.; PREZOTO, F. Influence of environmental factors on the foraging activity of *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v. 58, n. 1, p. 133, 2011.

DESUO, I. C. et al. Caste asymmetries in the Neotropical swarm-founding wasp *Polybia (Trychothorax) ignobilis* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). **Sociobiology**, v. 57, n. 1, p. 51-70, 2011.

DESUÓ, I. C. **Variação morfofisiológica das castas em algumas espécies de vespas enxameantes neotropicais (Vespidae: Epiponini) ao longo do ciclo colonial.** 2013. 175p. tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

DEVICARI, M.; LOPES, A. R.; SUESDEK, L. Dimorfismo sexual alar em *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae). **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 1-5, 2011.

DE SOUZA, D. A. et al. Morphometric identification of queens, workers and intermediates in in vitro reared honey bees (*Apis mellifera*). **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0123663, 2015.

DUJARDIN, J.P.. Morphometrics applied to medical entomology. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 875-890, 2008.

FELIPPOTTI, G. T. et al. Discrete dimorphism among castes of the bald-faced hornet *Dolichovespula maculata* (Hymenoptera: Vespidae) in different phases of the colony cycle. **Journal of Natural History**, v. 43, n. 39-40, p. 2481-2490, 2009.

FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. **Temas em Biologia: Edição comemorativa aos**, v. 20, p. 101-120, 2012.

FOSTER, K. R. et al. Colony kin structure and male production in *Dolichovespula* wasps. **Molecular ecology**, v. 10, n. 4, p. 1003-1010, 2001.

FRANCOY, T. M.; FONSECA, V. L. I. A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 317-321, 2010.

GADAGKAR, R. Belonogaster, Mischocyttarus, Parapolybia, and independent-founding Ropalidia. **The social biology of wasps**, p. 149-190, 1991.

GALEANO, Z. J. G. **Mudanças morfológicas e glandulares associadas ao polietismo etário em *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae).** 2010. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências, e Letras de Ribeirão Preto da USP, São Paulo, 2010.

GARCIA, Z. J.; NOLL, F. B. Age and morphological changes in the Epiponini wasp *Polybia paulista* Von Ihering (Hymenoptera: Vespidae). **Neotropical entomology**, v. 42, n. 3, p. 293-299, 2013.

GREENE, A. *Dolichovespula* and *Vespula*. **The social biology of wasps**, v. 263, p. 305, 1991.

HENSHAW, M. T.; STRASSMANN, J. E.; QUELLER, D. C. The independent origin of a queen number bottleneck that promotes cooperation in the African swarm-founding wasp, *Polybioides tabidus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 48, n. 6, p. 478-483, 2000.

HERMANN, H. R.; CHAO, J. T. Nesting biology and defensive behavior of *Mischocyttarus* (*Monocyttarus*) *mexicanus cubicola* (Vespidae: Polistinae). **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 91, n. 1-2, p. 51-65, 1984.

HERMES, M. G.; KÖHLER, A. Chave ilustrada para as espécies de Vespidae (insecta, hymenoptera) ocorrentes no Cinturão Verde de Santa Cruz do sul. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v.16, n. 2, p. 65-115, 2004.

HINES, H. M. et al. Multigene phylogeny reveals eusociality evolved twice in vespid wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3295-3299, 2007.

HUNT, J. H.; BAKER, I.; BAKER, H. G. Similarity of amino acids in nectar and larval saliva: the nutritional basis for trophallaxis in social wasps. **Evolution**, v. 36, n. 6, p. 1318-1322, 1982.

HUNT, J. H. Lobe erection behavior and its possible social role in larvae of *Mischocyttarus* paper wasps. **J. Insect Behav**, v. 1, n. 4, p. 379-386, 1988.

HUNT, J. H. et al. Differential gene expression and protein abundance evince ontogenetic bias toward castes in a primitively eusocial wasp. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10674, 2010.

HUNT, J. H. A conceptual model for the origin of worker behaviour and adaptation of eusociality. **Journal of evolutionary biology**, v. 25, n. 1, p. 1-19, 2012.

ISHIKAWA, Y. et al. Dominance hierarchy among workers changes with colony development in *Polistes japonicus* (Hymenoptera, Vespidae) paper wasp colonies with a small number of workers. **Insectes sociaux**, v. 57, n. 4, p. 465-475, 2010.

- ITÔ, Y. Social behaviour and social structure of Neotropical paper wasps *Mischocyttarus angulatus* Richards and *M. basimacula* (Cameron). **Journal of Ethology**, v. 2, n. 1, p. 17-29, 1984.
- JANDT, J. M.; TIBBETTS, E. A.; TOTH, A. L. Polistes paper wasps: a model genus for the study of social dominance hierarchies. **Insectes Sociaux**, v. 61, n. 1, p. 11-27, 2014.
- JEANNE, R. L. Evolution of social behavior in the Vespidae. **Annual review of entomology**, v. 25, n. 1, p. 371-396, 1980.
- JEANNE, R. L. The evolution of the organization of work in social insects. **Monitore Zoologico Italiano-Italian Journal of Zoology**, v. 20, n. 2, p. 119-133, 1986.
- JONES, T. A.; DONLAN, N. A.; O'DONNELL, S. Growth and pruning of mushroom body Kenyon cell dendrites during worker behavioral development in the paper wasp, *Polybia aequatorialis* (Hymenoptera: Vespidae). **Neurobiology of learning and memory**, v. 92, n. 4, p. 485-495, 2009.
- JUDD, T. M.; MAGNUS, R. M.; FASNACHT, M. P. A nutritional profile of the social wasp *Polistes metricus*: Differences in nutrient levels between castes and changes within castes during the annual life cycle. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 1, p. 42-56, 2010.
- JUDD, T. M. et al. Quantitative differences in nourishment affect caste-related physiology and development in the paper wasp *Polistes metricus*. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0116199, 2015.
- KAPHEIM, K. M. Nutritional, endocrine, and social influences on reproductive physiology at the origins of social behavior. **Current opinion in insect science**, v. 22, p. 62-70, 2017.
- KANDEMIR, Irfan; ÖZKAN, Ayça; FUCHS, Stefan. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. **Apidologie**, v. 42, n. 5, p. 618, 2011.
- KARDONG, K. V. **Vertebrates, Comparative Anatomy, Function, Evolution**. Dubuque: Wm. C. 1995.
- KEEPING, M. G. Reproductive and worker castes in the primitively eusocial wasp *Belonogaster petiolata* (DeGeer)(Hymenoptera: Vespidae): evidence for pre-imaginal differentiation. **Journal of insect physiology**, v. 48, n. 9, p. 867-879, 2002.

KELLER, L.; PERRIN, N. Quantifying the level of eusociality. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 260, n. 1359, p. 311-315, 1995.

KLINGENBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 2, p. 353-357, 2011.

LITTE, M. *Mischocyttarus flavitarsis* in Arizona: social and nesting biology of a polistine wasp. **Zeitschrift für Tierpsychologie**, v. 50, n. 3, p. 282-312, 1979.

LONDON, K. B.; JEANNE, R. L. The interaction between mode of colony founding, nest architecture and ant defense in polistine wasps. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 12, n. 1, p. 13-25, 2000.

MACEDO, M. P. Morfometria geométrica alar como ferramenta para a identificação de *Lucilia sericata* e *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 6, n. 1, p. 62-65, 2016.

MONTAGNA, T. S.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Morphological Differences between Reproductive and Non-reproductive Females in the Social Wasp *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera: Vespidae). **Sociobiology**, v. 63, n. 1, p. 693-698, 2016.

MONTEIRO, L.R.; REIS, S.F. **Princípios de Morfometria Geométrica**. 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, 1999.

MORAES, DA de. A morfometria geométrica ea “Revolução na Morfometria” localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **Bioletim–Rev. Divul. Cient. Estud. Biol**, v. 3, p. 1-5, 2003.

MURAKAMI, A. S. N.; SHIMA, S. N. Nutritional and social hierarchy establishment of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini) and related aspects. **Sociobiology**, v. 48, n.1, p. 183-207, 2006.

MURAKAMI, A. S.N.; SHIMA, S. N.; DESUÓ, I. C. More than one inseminated female in colonies of the independent-founding wasp *Mischocyttarus cassununga* von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 4, p. 653-662, 2009.

MURAKAMI, A. S. N. **Mediadores comportamentais e comunicação química da vespa eussocial basal *Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga* Von Ihering, 1903 (Hymenoptera, Vespidae, Mischocyttarini)**. 2012. 217 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2012.

MURAKAMI, A. S. N.; DESUÓ, I. C.; SHIMA, S. N. Division of labor in stable social hierarchy of the independent-founding wasp *Mischocyttarus (Monocyttarus) cassununga*, Von Ihering (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v. 60, n. 1, p. 114-122, 2013.

NAWROCKA, A. et al. Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages. **Apidologie**, v. 49, n. 2, p. 172-184, 2018.

NODA, S. C. M.; SILVA, E. R. d.; GIANNOTTI, E. Dominance hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cerberus styx* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v.38, n. 3, p. 603-614, 2001.

NODA, S. C. M. **Determinação e diferenciação de castas em *Mischocyttarus (Mischocyttarus) drewseni* Saussure, 1857 (Hymenoptera, Vespidae) de acordo com a perspectiva nutricional e aspectos relacionados**. 2005. 119p. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2005.

NOLL, F. B. et al. Caste Differences in *Polybia emaciata*, a Mud-Nesting Eusocial Wasp (Hymenoptera: Vespidae), that Bear on Pre-Imaginal Determination but not Size Differences. **Sociobiology**, v. 53, n. 1, p. 189, 2009.

O'DONNELL, S. Reproductive caste determination in eusocial wasps (Hymenoptera: Vespidae). **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 323-346, 1998.

O'DONNELL, S. Dominance and polyethism in the eusocial wasp *Mischocyttarus mastigophorus* (Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 43, n. 4-5, p. 327-331, 1998.

O'DONNELL, S. et al. Adult nutrition and reproductive physiology: a stable isotope analysis in a eusocial paper wasp (*Mischocyttarus mastigophorus*, Hymenoptera: Vespidae). **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 72, n. 6, p. 86, 2018.

OLIVEIRA, V. C. de. **Diferenciação etológica e morfofisiológica das castas de *Mischocyttarus (Monogynoecus) montei*, Zikán, 1949 (Hymenoptera, vespidae, mischocyttarini), com especial referência à regulação social das colônias**. 2007. 165 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2007.

PENNA, M. A. H. et al. Comparative productivity of *Mischocyttarus cerberus* styx (Richards, 1940) and *Mischocyttarus cassununga* Saussure (von Ihering, 1903) in an anthropic environment as evaluation for differences in ecological strategies. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 9, n. 2, p. 205-212, 2007.

PERRARD, A. et al. Differences in caste dimorphism among three hornet species (Hymenoptera: Vespidae): forewing size, shape and allometry. **Journal of evolutionary biology**, v. 25, n. 7, p. 1389-1398, 2012.

PERRARD, A.; LOOPE, K. J. Patriline differences reveal genetic influence on forewing size and shape in a Yellowjacket Wasp (Hymenoptera: Vespidae: *Vespula flavopilosa* Jacobson, 1978). **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0130064, 2015.

PERRARD, A.; LOPEZ-OSORIO, F.; CARPENTER, J. M. Phylogeny, landmark analysis and the use of wing venation to study the evolution of social wasps (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae). **Cladistics**, v. 32, n. 4, p. 406-425, 2016.

PETROCELLI, I.; TURILLAZZI, S. The morphology of V an der V ecth's organ as a tool to measure caste dimorphism in *Polistes* paper wasps: a comparative approach. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 51, n. 4, p. 274-278, 2013.

PIEKARSKI, P. K. Monophyly of eusocial wasps (Hymenoptera: Vespidae): molecules and morphology tell opposing histories. **Journal of Undergraduate Research in Alberta**, v. 4, p. 11-14, 2014.

PIEKARSKI, P. K. et al. Phylogenomic evidence overturns current conceptions of social evolution in wasps (Vespidae). **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 9, p. 2097-2109, 2018.

PREZOTO, F. et al. Dominance hierarchy in different stages of development in colonies of the primitively eusocial wasp *Mischocyttarus cassununga* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, vol. 44, n. 2, p. 379-390, 2004.

REHAN, S. M.; TOTH, A. L. Climbing the social ladder: the molecular evolution of sociality. **Trends in ecology & evolution**, v. 30, n. 7, p. 426-433, 2015.

RIBEIRO, P. L. Insetos Eusociais e o desafio para a idéia de seleção natural. **Revista da Biologia**, v. 3, p. 6-8, 2009.

RICHARDS, O. W. The biology of the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). **Biological Reviews**, v. 46, n. 4, p. 483-528, 1971.

RICHARDS, O. W. The social wasps of the Americas, excluding the Vespinae (Hymenoptera, Vespidae). **Transactions of the Entomological Society of London**, v. 102, p. 1-170, 1978.

RICHTER, M. R. Social wasp (Hymenoptera: Vespidae) foraging behavior. **Annual review of entomology**, v. 45, n. 1, p. 121-150, 2000.

ROCHA, A. A.; GIANNOTTI, E. External Morphology of Immatures of *Mischocyttarus nomurae* Richards (Hymenoptera, Vespidae) during the Post-embryonic Development. **Sociobiology**, v. 63, n. 3, p. 998-1005, 2016.

ROHLF, F. J.; SLICE, D. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. **Systematic Biology**, v. 39, n. 1, p. 40-59, 1990.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F. A revolution morphometrics. **Trends in ecology & evolution**, v. 8, n. 4, p. 129-132, 1993.

ROHLF, F. J. **tps-UTIL, File Utility Program, Version 1.60 [Software and Manual]**. Disponível em: <<https://life.bio.sunysb.edu/morph/morphmet/tpsutilw32.exe>>. Acesso em: 02 março 2020.

ROHLF, F. J. **TPS Dig 2.19 and TPS relative wards software**. Disponível em: <<https://life.bio.sunysb.edu/morph/morphmet/tpsdig2w32.exe>>. Acesso em: 02 março 2020.

RÖSELER, P.-F.; RÖSELER, I. Dominance of ovariectomized foundresses of the paper wasp, *Polistes gallicus*. **Insectes Sociaux**, v. 36, n. 3, p. 219-234, 1989.

SCHMIDT, K. C.; HUNT, B. G.; SMITH, C. R. Queen, worker, and male yellowjacket wasps receive different nutrition during development. **Insectes sociaux**, v. 59, n. 2, p. 289-295, 2012.



SILVEIRA, O. T. Phylogeny of wasps of the genus *Mischocyttarus* de Saussure (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 4, p. 510-549, 2008.

SHERMAN, P. W. et al. The eusociality continuum. **Behavioral Ecology**, v. 6, n. 1, p. 102-108, 1995.

SLICE, D. E. (Ed.). **Modern morphometrics in physical anthropology**. Springer Science & Business Media, 2006.

SMITH, C. R. et al. Nutritional asymmetries are related to division of labor in a queenless ant. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e24011, 2011.

SOARES, E. R. P.; TORRES, V. O.; ANTONIALLI-JUNIOR, W. F. Reproductive status of females in the eusocial wasp *Polistes ferreri* Saussure (Hymenoptera: Vespidae). **Neotropical entomology**, v. 43, n. 6, p. 500-508, 2014.

SONTIGUN, N. et al. Wing morphometric analysis of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) in Thailand. **Acta tropica**, v. 190, p. 312-319, 2019.

SPRADBERRY, J. P. A biometric study of seasonal variation in worker wasps (Hymenoptera: Vespidae). **Journal of Entomology Series A, General Entomology**, v. 47, n. 1, p. 61-69, 1972.

SUNGVORNYOTHIN, S. et al. Geometric morphometrics of the scutum for differentiation of trombiculid mites within the genus *Walchia* (Acariformes: Prostigmata: Trombiculidae), a probable vector of scrub typhus. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 2, p. 495-503, 2019.

TORRES, V. D. O. et al. Bionomics aspects of the Neotropical social wasp *Polistes canadensis canadensis* (Linnaeus) (Hymenoptera, Vespidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 1, p. 134-138, 2009.

TORRES, V. O. et al. Division of labor in colonies of the eusocial wasp, *Mischocyttarus consimilis*. **Journal of insect science**, v. 12, n. 1, p. 21, 2012.

TORRES, V. O. et al. Reproductive status of the social wasp *Polistes versicolor* (Hymenoptera, Vespidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 2, p. 218-224, 2014.

TSUJI, K. Sterility for life: applying the concept of eusociality. **Animal behaviour**, v. 44, p. 572-573, 1992.

TURILLAZZI, S. Tegumental glands in the abdomen of some European *Polistes* (Hymenoptera Vespidae). **Monitore Zoologico Italiano-Italian Journal of Zoology**, v. 13, n. 1, p. 67-70, 1979.

TURILLAZZI, S. The origin and evolution of social life in the Stenogastrinae (Hymenoptera, Vespidae). **Journal of insect behavior**, v. 2, n. 5, p. 649-661, 1989.

TURILLAZZI, S. The Evolution of Social Behaviour in Insects and the Hover Wasps. In: **The Biology of Hover Wasps**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 233-263.

VILLET, M. H. Definitions of «caste» in social insects. **Ethology ecology & evolution**, v. 4, n. 3, p. 213-224, 1992.

WHEELER, D. E. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. **The American Naturalist**, v. 128, n. 1, p. 13-34, 1986.

WILSON, E. O. The evolution of caste systems in social insects. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 123, n. 4, p. 204-210, 1979.

WILSON, E. O.; HÖLLDOBLER, B. Eusociality: origin and consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13367-13371, 2005.

ZELDITCH, M. L.; SWIDERSKI, D. L.; SHEETS, H. D. **Geometric morphometrics for biologists: a primer**. 2 ed. San Diego: Elsevier, 2012.