

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Efectos de la estrategia vital y de la especialización ecológica
en la evolución de la morfología en los himenópteros: un
enfoque comparativo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alberto Jorge García

Directores

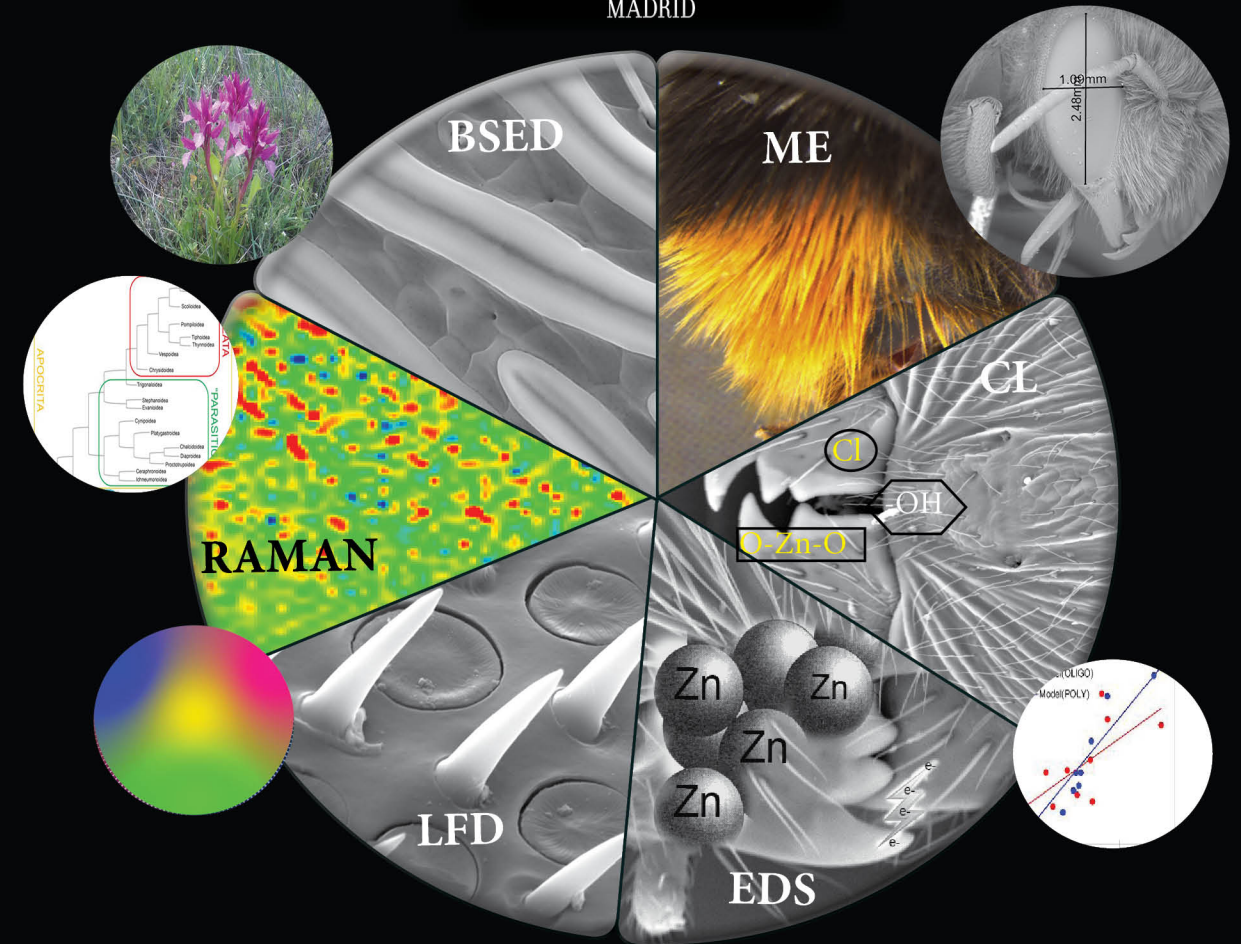
Carlo Polidori
José Luis Nieves-Aldrey
Concepción Ornos Gallego

Madrid
Ed. electrónica 2019

Efectos de la estrategia vital y de la especialización ecológica en la evolución de la morfología en los himenópteros: un enfoque comparativo



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



Alberto Jorge García

Carlo Polidori
José Luis Nieves-Aldrey
Concepción Ornos Gallego

Facultad de Ciencias Biológicas
Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC)



Diapriidae

Efectos de la estrategia vital y de la especialización ecológica en la evolución de la morfología en los himenópteros: un enfoque comparativo

Alberto Jorge García



Universidad
Complutense
Madrid



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL



Efectos de la estrategia vital y de la especialización ecológica en la evolución de la morfología en los himenópteros: un enfoque comparativo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Alberto Jorge García

DIRECTORES:

Carlo Polidori, José Luis Nieves-Aldrey, Concepción Ornos Gallego

Madrid, 2018

© Alberto Jorge García, 2018

UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE
MADRID

Facultad de Ciencias
Biológicas

Departamento de Biodiversidad,
Ecología y Evolución.



MUSEO NACIONAL DE
CIENCIAS NATURALES
(CSIC)



Instituto de Ciencias
Ambientales (ICAM)

UNIVERSIDAD DE
CASTILLA-LA MANCHA



Efectos de la estrategia vital y de la especialización ecológica en la evolución de la morfología en los himenópteros: un enfoque comparativo



MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Alberto Jorge García

DIRECTORES:

Vº. Bº. Dr. Carlo Polidori Vº. Bº. Dr. José Luis Nieves-Aldrey Vº. Bº. Dra. Concepción Ornos Gallego

Instituto de Ciencias
Ambientales (ICAM)

UNIVERSIDAD DE
CASTILLA-LA MANCHA

MUSEO NACIONAL DE
CIENCIAS NATURALES
(CSIC)

UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Madrid, 2018

¡A Teodoro y Ángela, mis padres!

Porque entre muchas cosas siempre han apoyado y respetado mi libertad en decidir todos mis proyectos, humanos y científicos.

Por ser mi gran modelo de lucha y superación.

Por inculcarme que el sacrificio tiene su recompensa y que, aunque es importante ser el primero, cada caminante marca un ritmo diferente a sus pasos. Pero lo importante es llegar.

¡A mi gran amor, Susi!

Por su amor, generosidad y cariño incondicional.

Por su apoyo y gran confianza en mis posibilidades.

Sabes que eres la responsable de toda esta aventura!

Pero sobre todo por ser como es... excelentemente maravillosa!

Por haberme enseñado que de nada sirve poseer si no sabemos apreciar.

Es por todos vosotros por lo que siempre he actuado teniendo claro y presente que:

“los deberes son intransferibles”!

*En esta tarde llueve, y llueve pura
tu imagen. En mi recuerdo el día se abre.*

[Entraste.

No oigo. La memoria me da tu imagen sólo.

solo tu beso o lluvia cae en recuerdo.

Llueve tu voz, y llueve el beso triste,

el beso hondo,

beso mojado en lluvia. El labio es húmedo.

Húmedo de recuerdo el beso llora

desde unos cielos grises

delicados.

Llueve tu amor mojando mi memoria

y cae y cae. El beso

al hondo cae. Y gris aún cae

la lluvia.

Llueve

Vicente Aleixandre

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo por su esfuerzo, dedicación y apoyo a mis directores, Carlo Polidori, José Luis Nieves y Concepción Ornosá. Gracias por brindarme esta oportunidad: por la confianza y la responsabilidad delegada.

Esta tesis ha sido apoyada financieramente por una serie de proyectos y contratos asociados a mis directores de tesis y con algunos otros coautores de los diferentes artículos producidos a partir de esta tesis:

Carlo Polidori fue financiado por un contrato postdoctoral subvencionado por la Universidad de Castilla La Mancha y el FSE, por una subvención de SYNTHESYS en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) (ES-TAF-5333), y por un FCT (Fundação para a Ciência ea Tecnologia) subvención doctoral (SFRH / BPD / 100460/2014) y por el proyecto CGL2017-83046-P del Ministerio de Economía, y Empresa.

A ti, Carlo, quiero agradecerte tu confianza y ánimo contagioso en este proyecto desde el primer momento inspirándolo, fomentándolo, ofreciéndome nuevas expectativas y formándome perspectivas, pero, sobre todo, por tu trato de igual a igual. Gracias por compartir conmigo el esfuerzo y la ilusión clave para que este trabajo saliera adelante. Muchas gracias por ayudarme en todo lo posible, y a veces, en lo imposible..., siempre has estado ahí para lo que he necesitado poniéndome por delante de otras muchas cosas.

Tú has sido mi mejor escudo frente a las adversidades y el mejor compañero con quién compartir los éxitos, pero sobre todo lo que más valoro es la amistad que se ha

consolidado entre nosotros. Gracias por tu siempre tendida mano amiga. Carlo, no cambies y te deseo mucha suerte.

José Luis Nieves Aldrey fue apoyado por los proyectos de investigación CGL2005-01922 / BOS, CGL2009-10111 / BOS y CGL2010-15786 / BOS por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación.

A ti, José Luis muchas gracias por tu inestimable ayuda, apoyo y paciencia y tus clases particulares, donde aprendí mucho acerca de tus “avispillas” durante las fructíferas sesiones de Microscopía. Gracias por tu generosidad al ceder a mi entera disposición tu colección de las superfamilias Cynipoidea y Chalcidoidea que forman parte esencial de estos cuatro años. Esta colección representa ni más ni menos que 40 años de tu vida dedicados a muestreos y colectas en la Península Ibérica, Panamá, Chile, Méjico y Ecuador, Hungría y Sudáfrica entre otros. Muchas gracias.

Concepción OrnosaGallego cuenta con el apoyo de los proyectos de investigación RTA2013-00042-C10-00 AGL2015-65010-C3-1-R y CGL2017-83046-P del Ministerio de Economía y Empresa.

A ti, Paddy, muchísimas gracias por aportarme tranquilidad y sosiego, pero ante todo por confiar en mis posibilidades, abrirme tu puerta y enseñarme tanto, por tu cariño y seguridad infundida, por tu dedicación y tus correcciones, siempre meticulosas y enriquecedoras para este trabajo, porque ha sido siempre un placer el intercambio de opiniones en tu despacho de las que han emanado pertinentes y muy prudentes consejos. Sin ti, no hubiera sido posible.

A los colaboradores José Tormos y Josep Daniel Asís que contando con el apoyo financiero de la Junta de Castilla y León (SA094A09) y del Ministerio de Economía y Competitividad (CGL2010-16730) me han facilitado los medios suficientes para llevar a cabo una parte del desarrollo de esta tesis. Muchas gracias.

Agradecer también al Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) por brindarme toda su infraestructura.

La tesis también fue apoyada por un número de investigadores y técnicos que proporcionaron algunas de las especies de insectos estudiadas o dieron sugerencias útiles sobre la discusión de los resultados:

Agradezco a Mercedes Paris por su enorme disposición al frente de la colección de entomología del MNCN que facilitó la búsqueda de muchas de las especies utilizadas en esta tesis.

A Arabia Sánchez por su inestimable ayuda en el adiestramiento del microscopio estereoscópico.

Al servicio de Biblioteca y Archivo el MNCN y a todo su personal porque con su profesionalidad y amabilidad han hecho posible la consulta de numerosos libros, revistas y artículos necesarios para cumplir con las exigencias de esta tesis doctoral.

Al Profesor Javier García Guinea, fuente de sabiduría, por haber podido contar siempre con tu colaboración, tu tiempo y tus buenas recomendaciones. Porque cuando nos cruzábamos en el pasillo tenías el mismo interrogante: ¿cómo va esa tesis? Pues ya está aquí Javier, y espero que te guste. Al Dr. Ismael Galván (Estación Biológica de Doñana (CSIC), España) que participó amablemente en la discusión sobre la importancia de nuestros hallazgos sobre la pigmentación, gracias por enseñarme, escucharme, sugerirme y ayudarme. A los profesores José Martín Cano y Pilar Gurrea Sanz (Universidad Autónoma de Madrid, España) por su inestimable colaboración al proporcionarnos unas agallas de *Eschatocerus acaciae* (Mayr, 1881) de Argentina, y al profesor Leopoldo Castro que nos proporcionó los especímenes de *Bombus gerstaeckeri* (Morawitz, 1881).

También se agradece a todos los árbitros que evaluaron los trabajos publicados producidos hasta el momento de la tesis, su aportación con importantes sugerencias y comentarios mejoraron los manuscritos.

La tesis también contó con el inestimable apoyo de varias instituciones públicas que emitieron los permisos para los trabajos de campo y nos brindaron su ayuda técnica y gran profesionalidad durante las estancias en sus territorios:

El Ayuntamiento de Valencia (España), la Generalitat Valenciana (España), el Parque Regional de Maremma (Italia), el Parque Regional de Ticino (Italia) y la Estación Biológica Huinay (Chile) emitieron los permisos necesarios para recoger algunos de los especímenes estudiados y apoyaron las campañas de recolección.

Finalmente, la tesis fue apoyada por familiares, compañeros y amigos:

Mi más cariñoso agradecimiento a Agustín, mi suegro, por su generosidad y por prestarme su atención y ayuda cuando lo he solicitado.

A Rosa, de Secretaría de la Universidad Complutense, por su profesionalidad y templanza en su inestimable ayuda en las cuestiones administrativas.

Al coordinador de este programa de doctorado el profesor Agustín González Gallegos y a la que fue Vicedecana de Posgrado y Extensión Cultural la profesora Esther Pérez Corona, por estar siempre dispuestos a brindarnos su lluvia de sugerencias y opiniones bajo el paraguas de su gran experiencia. Gracias a ambos.

A Diego Cepeda, por conjurar el desánimo a base de risas con los nombres latinos de sus fascinantes gusanos poliquetos y por su inestimable ayuda durante los congresos en la UCM.

A Diego Gil, con el que he compartido comprensión y confidencias científicas y personales.

A ti, Marisol, por tu gran dulzura y deliciosas conversaciones cuando necesitaba descansar. Te echo de menos.

Mi eterno agradecimiento a Andrés Ledesma, gracias por dar luz a mis sombras y por tu omnisciencia de las relaciones humanas. Agua clara.

A mis amigos y compañeros del Club Bádminton de Alcalá, cuatro horas a la semana que me he ahorrado en terapias.

En definitiva, a todos aquellos que de alguna manera han formado parte de esta tesis, que me habéis hecho pasar estos buenos años y que me dedicasteis vuestro apoyo para seguir adelante.

¡A todos, Muchísimas GRACIAS!

Los experimentos cumplen con la ley española actual.

ÍNDICE

1. Resumen/Summary	7
2. Introducción	13
2.1. Abejas, avispas y hormigas: el orden Hymenoptera	15
2.2. Clasificación y filogenia de los Hymenoptera	19
2.2.1. Suborden Symphyta	21
2.2.2. Suborden Apócrita	22
2.2.2.1. Grupo Terebrantia	23
2.2.2.1.1. Superfamilia Cynipoidea	26
2.2.2.2. Grupo Aculeata	29
2.2.2.2.1. Superfamilia Apoidea	31
2.3. Ecomorfología en los Hymenoptera	35
3. Objetivos de la tesis	41
4. Materiales y métodos	53
4.1. Trabajo museístico y otras fuentes del material estudiado	55
4.2. Trabajo de laboratorio	57
4.2.1. Preparación de muestras	58
4.2.2. Técnicas analíticas no destructivas	60
4.2.2.1. Microscopía estereoscópica	61
4.2.2.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	61
4.2.2.3. Cátodoluminiscencia fría (CL)	65
4.2.2.4. Energía dispersiva de Rayos X (EDX)	71
4.2.2.5. Espectroscopia Raman	73

4.3. Análisis de los datos	77
5. Resultados y Discusiones	81
5.1. Capítulo I: Spectral cathodoluminescence analysis of Hymenopteran	
mandibles with different levels of zinc enrichment in their teeth	83
5.1.1. Resumen	85
5.1.2. Abstract	90
5.1.3. Introduction	91
5.1.4. Materials and Methods	94
5.1.5. Results	99
5.1.6. Discussion	106
5.1.7. Supporting Information	111
5.2. Capítulo II: Zn and Mn incorporation in the mandibles of Hymenoptera	
(Insecta): an adaptation to certain life-history traits?	115
5.2.1. Resumen	117
5.2.2. Abstract	122
5.2.3. Introduction	123
5.2.4. Materials and Methods	126
5.2.5. Results	128
5.2.6. Discussion	139
5.3. Capítulo III: Pheomelanin in the secondary sexual characters of male	
parasitoid wasps (Hymenoptera: Pteromalidae)	145
5.3.1. Resumen	147
5.3.2. Abstract	152
5.3.3. Introduction	153

5.3.4. Materials and Methods	156
5.3.5. Results	159
5.3.6. Discussion	166
5.3.7. Supporting Information	170
5.4. Capítulo IV: Eumelanin and pheomelanin are predominant pigments	
in bumblebee (Apidae: <i>Bombus</i>) pubescence	173
5.4.1. Resumen	175
5.4.2. Abstract	180
5.4.3. Introduction	181
5.4.4. Materials and Methods	183
5.4.5. Results	189
5.4.6. Discussion	197
5.4.7. Supplemental Information	202
5.5. Capítulo V: Antennal sensilla in male gall-wasps and insights on the	
evolution of sexual dimorphism in sensory equipment (Hymenoptera:	
Cynipidae)	205
5.5.1. Resumen	207
5.5.2. Abstract	212
5.5.3. Introduction	213
5.5.4. Materials and Methods	216
5.5.5. Results	227
5.5.6. Discussion	247
5.6. Capítulo VI: Smelling the right plant: is there a link between pollen	
specialization and peripheral sensory system in bees?	255
5.6.1. Resumen	257

5.6.2. Abstract	262
5.6.3. Introduction	263
5.6.4. Materials and Methods	266
5.6.5. Results	271
5.6.6. Discussion	283
6. Discusión integradora	289
7. Conclusiones generales	301
8. Posibles desarrollos futuros	307
9. Abreviaturas	317
10. Referencias bibliográficas	323
11. Listado de publicaciones	365



Amy Cohen, la esposa del biólogo chileno Francisco Varela, escribió lo siguiente tras su muerte prematura hace unos cuantos años:

Un viejo amigo de Francisco me dijo una vez "Francisco no tiene techo".

Siempre me gustó esa metáfora [continúa Amy] porque, paradójicamente invoca la noción de una forma de construir. Los cimientos están ahí, los muros de carga y las varillas, pero sin un techo no está terminada y en ese sentido presenta infinitas posibilidades; está expuesta a los elementos y por ello necesita inventiva y flexibilidad.

I

Resumen/Summary

Resumen

Los insectos constituyen una de las clases de animales más importantes en cuanto a abundancia de individuos y número de especies en todos los ecosistemas terrestres, y los Hymenoptera (abejas, avispas y hormigas) constituyen uno de los grupos más diversos de insectos. El orden es muy heterogéneo en ecología y comportamiento, incluyendo formas herbívoras y carnívoras, solitarias y sociales, parásitas o de vida libre, o con larvas criadas en nidos, en agallas o en hospedadores de varios tipos. Esto hace de los himenópteros un grupo ideal para estudios de adaptaciones morfo-fisiológicas y de evolución. En esta tesis, se pretenden verificar los posibles vínculos entre la diversidad de rasgos relacionados con la estrategia vital y con la especialización ecológica y aspectos morfo-fisiológicos en diferentes linajes de himenópteros. Los objetivos que se han planteado obedecen a hipótesis relacionadas con 1) la evolución de la dureza de la cutícula (análisis de metales integrados en las mandíbulas) en función de tipo de substrato donde reproducirse, 2) la evolución del aparato sensorial antenal en función de la especialización en el uso del recurso trófico y de las relaciones inter-sexuales, y 3) la diversidad de los patrones de pigmentación en función de los tipos bioquímicos de los pigmentos. Para el cumplimiento de los objetivos se ha utilizado una variedad de técnicas analíticas como la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), la Energía Dispersiva por Rayos X (EDS), la Cátodoluminiscencia fría (CL) y la Espectroscopía Raman, todas ellas técnicas no destructivas, permitiendo así trabajar con numeroso material entomológico procedente de las colecciones de museos de Historia Natural. En el primer capítulo se ha usado, de forma novedosa, la Cátodoluminiscencia fría para el estudio de los cambios de estructura cuticular de las mandíbulas y además se han identificado los niveles de Zn necesarios para que se produzca dicho cambio estructural. En el segundo capítulo se ha estudiado los niveles de inclusión de Zn en las mandíbulas,

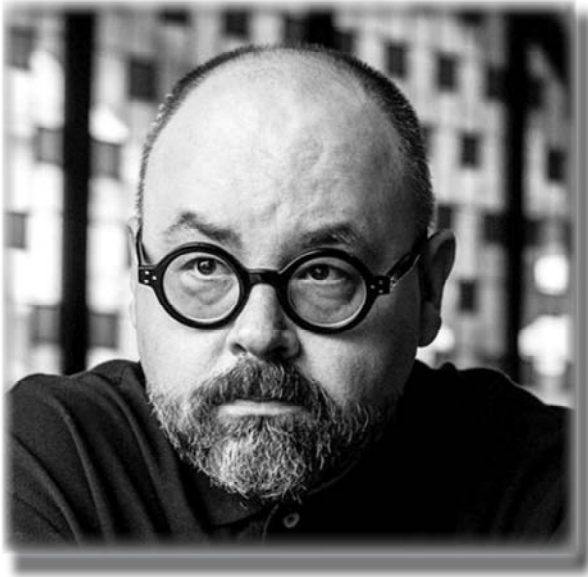
dentro de la mayoría de los principales linajes conocidos, y se ha encontrado la existencia de un efecto filogenético sobre la variabilidad en los niveles del metal, mientras que todavía es poco claro, y sin embargo no descartable, el efecto de eventuales rasgos ecológicos que hayan podido promover la inclusión de metales en las mandíbulas. En el tercer capítulo se han caracterizado, por Espectroscopía Raman, los tipos de melaninas presentes en las manchas coloreadas (rasgo sexual secundario) de la cutícula en los machos del género *Mesopolobus* (Westwood, 1833) (Pteromalidae) donde se han encontrado eumelanina y feomelanina, esta última desconocida hasta el momento en himenópteros y con solo un caso previo conocido en insectos. En el cuarto capítulo se amplía el conocimiento sobre la base bioquímica de los patrones de color en el género *Bombus* (Apidae) mediante Espectroscopía Raman; el estudio evidencia, en contraste con hipótesis previas, que todas las coloraciones encontradas en la pubescencia de las diferentes especies se deben sustancialmente a una mezcla de eumelanina y feomelanina (excepto el blanco, que no contiene pigmentos). En el quinto capítulo, se ha estudiado el equipamiento sensorial antenal de los machos en la superfamilia Cynipoidea; los resultados muestran una gran variedad de sensilas en las antenas, no encontrándose un efecto de la filogenia sobre esta variabilidad, acreditándose un dimorfismo sexual que parece variar con la estrategia de vida (productores de agallas o no). El último capítulo es un estudio sobre las sensilas antenales en abejas y su relación con la especialización en el uso de las plantas para el polen (oligoléctica (especializada) frente a poliléctica (generalista)); se documenta que las especies oligoléticas presentan mayor densidad de sensilas de un tipo concreto (sensila tricoidea), sugiriendo que la especialización ha jugado un papel en la evolución del sistema sensorial de las abejas. La tesis, en su conjunto, añade novedosas informaciones sobre la relación entre morfología, fisiología y ecología en los himenópteros, y abre, a través del uso de técnicas hasta el momento

poco consideradas (especialmente no destructivas), las puertas a nuevas hipótesis evolutivas.

Summary

Insects are one of the most important groups of animals in terms of abundance of individuals and number of species in all terrestrial ecosystems, and Hymenoptera (bees, wasps and ants) are one of the most diverse orders of insects. The order is very heterogeneous in its ecological and behavioral traits, including herbivorous and carnivorous species, solitary and social species, parasitic or free-living species, and including species with larvae reared in nests, in galls or in hosts of various types. This makes the Hymenoptera an ideal group for studies on morphological and physiological adaptations and phenotypic evolution. In this thesis, I intend to verify the possible links between the diversity of features related to the life-history strategy and ecological specialization and some morpho-physiological aspects in different lineages of Hymenoptera. The objectives of the thesis are based on hypotheses related to 1) the evolution of the hardness of the cuticle (analysis of metals integrated in the mandibles) as a function of the type of substrate in which larvae are reared, 2) the evolution of the antennal sensory apparatus as a function of specialization in the use of trophic resources and inter-sexual relationships; and 3) the diversity of pigmentation patterns in relation with the biochemical types of the pigments responsible for coloration. A variety of analytical techniques such as Scanning Electron Microscopy (SEM), X-ray Dispersive Energy (EDS), Cathodoluminescence (CL) and Raman Spectroscopy, all non-destructive techniques, have been used to achieve the objectives, thus allowing to work with entomological samples preserved in the collections of Natural History museums. In the first chapter, cathodoluminescence has been used in a novel way to study the changes in the cuticular structure of the mandibles and, in addition, to analyze the levels of Zn necessary for this structural change. In the second chapter we have studied the Zn inclusion levels in the mandibles in most of lineages (families), and

I have found the existence of a phylogenetic effect on the variability of metal levels, while the effect of ecological factors that may have promoted the inclusion of metals in the mandibles remain unclear. In the third chapter I have characterized, by Raman spectroscopy, the types of melanins present in the colored spots of the cuticle (secondary sexual character) in males of the genus *Mesopolobus* (Pteromalidae), revealing eumelanin and pheomelanin, the latter pigment having been unknown until the moment in Hymenoptera and providing the second case known in insects. In the fourth chapter the study on the biochemical basis of the color patterns is extended in the genus *Bombus* (Apidae), also by Raman spectroscopy; the study evidences, in contrast to previous hypotheses, that all the colorations found in the pubescence of the different species are due substantially to a mixture of eumelanin and pheomelanin (except the white, which does not contain pigments). In the fifth chapter, the antennal sensory equipment of males in the superfamily Cynipoidea was studied; the results show a great variety of sensilla in the antennae, with a weak effect of the phylogeny on this variability, furthermore demonstrating a sexual dimorphism that seems to vary with the life strategy (gall-producing or not). The last chapter is a study on the antennal sensilla in bees and their relationship with the specialization in the use of plants for pollen (oligolectic (specialized) *versus* polylectic (generalist)); it is found that oligolectic species have a higher density of sensilla tricoidea compared with polylectic species, suggesting that specialization has played a role in the evolution of the sensory system of bees. The thesis, as a whole, adds new information about the relationship between morphology, physiology and ecology in Hymenoptera, and opens, through the use of techniques until now little considered (especially those which are non-destructive), to new evolutionary hypotheses.



“Una historia no tiene ni principio ni fin, tan sólo puertas de entrada. Una historia es un laberinto infinito de palabras, imágenes y espíritus conjurados para desvelarnos la verdad invisible sobre nosotros mismos. Una historia es, en definitiva, una conversación entre quien la narra y quien la escucha, y un narrador solo puede contar hasta donde llega el oficio y un lector solo puede leer hasta donde lleva escrito en el alma... Eso y la esperanza que todo hacedor de cuentos lleva dentro: que el lector haya abierto su corazón a alguna de sus criaturas de papel y le haya entregado algo de sí mismo para hacerla inmortal, aunque solo sea por unos minutos”.

El Laberinto de los Espíritus. (El Cementerio de los Libros Olvidados, Volumen IV) de Carlos Ruiz Zafón

II

Introducción

2.1. Abejas, avispas y hormigas: el orden Hymenoptera.

Entre todos los organismos vivientes, los insectos constituyen uno de los grupos más abundantes en cuanto al número de individuos y de especies en todos los ecosistemas terrestres. La aparición de nuevos estudios en la última década, basados en nuevos métodos y herramientas estadísticas, estiman que, en promedio, deben de existir aproximadamente, 1.5 millones, 5.5 millones y 7 millones de especies de escarabajos, insectos y artrópodos terrestres, respectivamente (Ødegaard, 2000; Nielsen & Mound, 2000; Stork *et al.*, 2015; Stork, 2017).

Entre las causas que podrían explicar la extraordinaria diversidad de los insectos se han señalado algunos factores como su pequeño tamaño y sus ciclos de vida especializados que les permite la ocupación de micronichos ecológicos y/o la colonización de nuevas áreas con la subsiguiente radiación adaptativa, su gran capacidad de dispersión, la fitofagia y parasitismo con especialización de hospedadores entre plantas vasculares y otros insectos, etc. (Erlich & Wilson, 1991; Nieves-Aldrey & Fontal, 1999).

El orden Hymenoptera, grupo de insectos en el que se circunscribe esta tesis, constituye junto a Coleoptera, Diptera y Lepidoptera uno de los cuatro grupos hiperdiversos de insectos (La Salle & Gauld, 1993). Las últimas estimaciones de diversidad apuntan a que el orden se compone de 2 subórdenes (Symphyta y Apocrita), 27 superfamilias (9 superfamilias en Symphyta y 18 en Apocrita), 132 familias, 8423 géneros existentes con 685 géneros extintos adicionales y es considerado uno de los órdenes de insectos más ricos en especies, detrás solo de Coleoptera y Lepidoptera, cuantificándose un total de 153.088 especies existentes,

además de 2.429 especies extintas (Aguiar *et al.*, 2013; Nieves-Aldrey & Sharkey, 2014).

En algunas zonas tropicales se ha demostrado que representan un componente fundamental de diversidad biológica (Stork, 1988), llegando a constituir el 25% de las especies de artrópodos e incluso han sido registrados como el orden de insectos con más especies en varias regiones templadas (Gastón, 1991).

Sin embargo, cabe señalar que estas estimaciones sobre diversidad en algunas familias de avispas parásitas pueden ser ilusorias como por ejemplo en las familias Braconidae, Ichneumonidae, Eulophidae o en los Cynipidae, donde las investigaciones en curso describen continuamente nuevas especies, y hacen que la clasificación sea permanentemente fluctuante (Rodríguez *et al.*, 2012; Veijalainen *et al.*, 2012; Medianero & Nieves-Aldrey, 2017).

Los himenópteros pueden ser definidos como insectos holometábolos haplodiploides, con piezas bucales masticadoras y dos pares de alas transparentes y membranosas (del griego *hymen* y *ptera*, membrana y ala, respectivamente) con relativa escasa venación, aunque a veces son ápteros. La mayor parte de las especies son solitarias, pero algunas familias destacan por su organización social compleja.

Dos de los rasgos que caracterizan el orden Hymenoptera lo definen como monofilético: 1) la posesión de dos pares de alas membranosas, un par posterior más pequeño articulado al primero por uno o más pequeños ganchos o hamuli, y 2) presentar un mecanismo de determinación del sexo haplo-diploide, por el cual los huevos fertilizados diploides normalmente dan lugar a hembras, mientras que los huevos haploides no fecundados dan lugar a machos.

Además de ser buenos indicadores de biodiversidad, también son buenos indicadores de impacto o alteración ambiental ya que, como sugirieron LaSalle & Gauld (1993), los himenópteros tienen tasas más bajas de diversidad genética que

otros insectos (Unruh & Messing, 1993), lo que implica mínimos viables de tamaño de población (MVP) más altos y, por tanto, mayor susceptibilidad a las perturbaciones ambientales y en definitiva a la extinción que otros insectos.

Desde el punto de vista económico su importancia para el hombre supera la de cualquier otro orden de insectos. Este grupo es clave en la provisión, regulación y dinámica de muchos servicios ecosistémicos (SE) (Weisser & Siemann, 2004; Schowalter, 2013). Estos servicios se pueden definir como las funciones beneficiosas y bienes que los humanos obtienen de los ecosistemas, que apoyan directa o indirectamente a nuestra calidad de vida (Daily, 1997; Klein *et al.*, 2007; Potts *et al.*, 2010; Harrington *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2015).

Algunas facetas de interés, que pueden ser destacadas en este sentido, son la polinización de plantas cultivadas, el control biológico por parte de himenópteros parasitoides de plagas agrícolas y forestales y la producción de miel y otros productos derivados de la apicultura (LaSalle & Gauld, 1993).

En este sentido, se destaca la polinización como un proceso ecosistémico fundamental para la reproducción, floración y supervivencia de las plantas con flores. Se ha estimado que más de 300.000 especies (87.5%) de las plantas con flores son polinizadas por animales (Ollerton *et al.*, 2011). La polinización mediada por animales es esencial para aproximadamente un tercio de la producción mundial de alimentos (Klein *et al.*, 2007). Las abejas son las más abundantes y diversos polinizadores, con más de 20.000 especies en todo el mundo (Neff & Simpson, 1993; Klein *et al.*, 2007; Michener, 2007). Un reciente estudio en 90 cultivos de todo el mundo demostró que 785 especies de abejas visitan las flores de cultivo (Kleijn *et al.*, 2015).

No menos importante para el ser humano es su valor medioambiental ya que se trata de un grupo de insectos que, no solo forman un componente principal de la Biodiversidad por sí mismo, estando presente en la mayor parte de los ecosistemas

terrestres, sino que es vital en el mantenimiento de la diversidad de otros grupos. Además de mantener la diversidad de las plantas flores polinizando sus flores y dispersando sus semillas, también pueden regular el tamaño de las poblaciones de artrópodos e incluso proporcionar recursos necesarios para la supervivencia de muchas especies de vertebrados (LaSalle & Gauld, 1993). Resulta muy importante llegar a conocer y preservar grupos de organismos que tienen una alta influencia sobre la diversidad de otros grupos biológicos.

El éxito de los himenópteros en la conquista del medio terrestre se ha interpretado como consecuencia de la evolución de cuatro caracteres o rasgos de comportamiento biológico que han sido cruciales en su éxito evolutivo: en primer lugar el mecanismo de ovoposición (usado tanto para la puesta como para la inyección de veneno), en segundo lugar la provisión parental de la larva (localización de la fuente de alimento sobre o en el interior de la cual se depositan los huevos), en tercer lugar la diversificación de la dieta larvaria y por último la determinación haplodiploide del sexo. El conjunto de todos estos mecanismos biológicos ha determinado una gran variedad de estrategias, especializaciones y diversidad de sus modos de vida, que van desde la fitofagia a la depredación, pasando por el parasitismo, la inducción de agallas, el consumo de semillas, la polinización de plantas y desde el comportamiento solitario hasta el mutualismo o la formación de sociedades complejas.

Las hembras de los himenópteros presentan varios grados de especialización en la elección de los recursos tróficos, desde dietas muy específicas hasta las muy generalistas. Por ejemplo, diferentes especies de cinípidos suelen especializarse en atacar órganos concretos de especies muy determinadas de plantas. Asimismo, las avispas depredadoras pueden cazar exclusivamente una sola especie de presa o especies de diferentes órdenes de insectos y arácnidos, y las abejas pueden colectar

polen exclusivamente de una o de unas pocas especies de plantas, o bien de plantas de muchas familias.

Toda esta variabilidad entre y dentro de los linajes (tipo de nidificación, substrato de ovoposición, tipo de presa, huésped o plantas para nutrir las larvas, y nivel de sociabilidad) hacen que los himenópteros sean un modelo excelente especialmente en lo referente a estudios comparados en ecología y morfología evolutiva, conservación y gestión de los recursos naturales.

2.2. Clasificación y filogenia de los Hymenoptera

En la presente tesis, se han contextualizado los resultados en marcos evolutivos recién publicados que se basan principalmente en evidencias moleculares, fósiles, morfológicas, ecológicas y etológicas:

- 1.- Para el orden Hymenoptera: Peters *et al.* (2017)
- 2.- Para la superfamilia Cynipoidea: Ronquist *et al.* (2015).
- 3.- Para la familia Cynipidae: Ronquist *et al.* (2015)
- 4.- Para la superfamilia Apoidea: Branstetter *et al.* (2017)

En su conjunto, estos estudios proporcionan las hipótesis filogenéticas para el orden Hymenoptera que se muestra en la Fig. 2.1.

Además, se han considerado otros estudios dedicados a géneros concretos, como *Bombus*, ya que hay parte de los análisis que se han enfocado sobre este nivel de detalle taxonómico (ver Resultados).

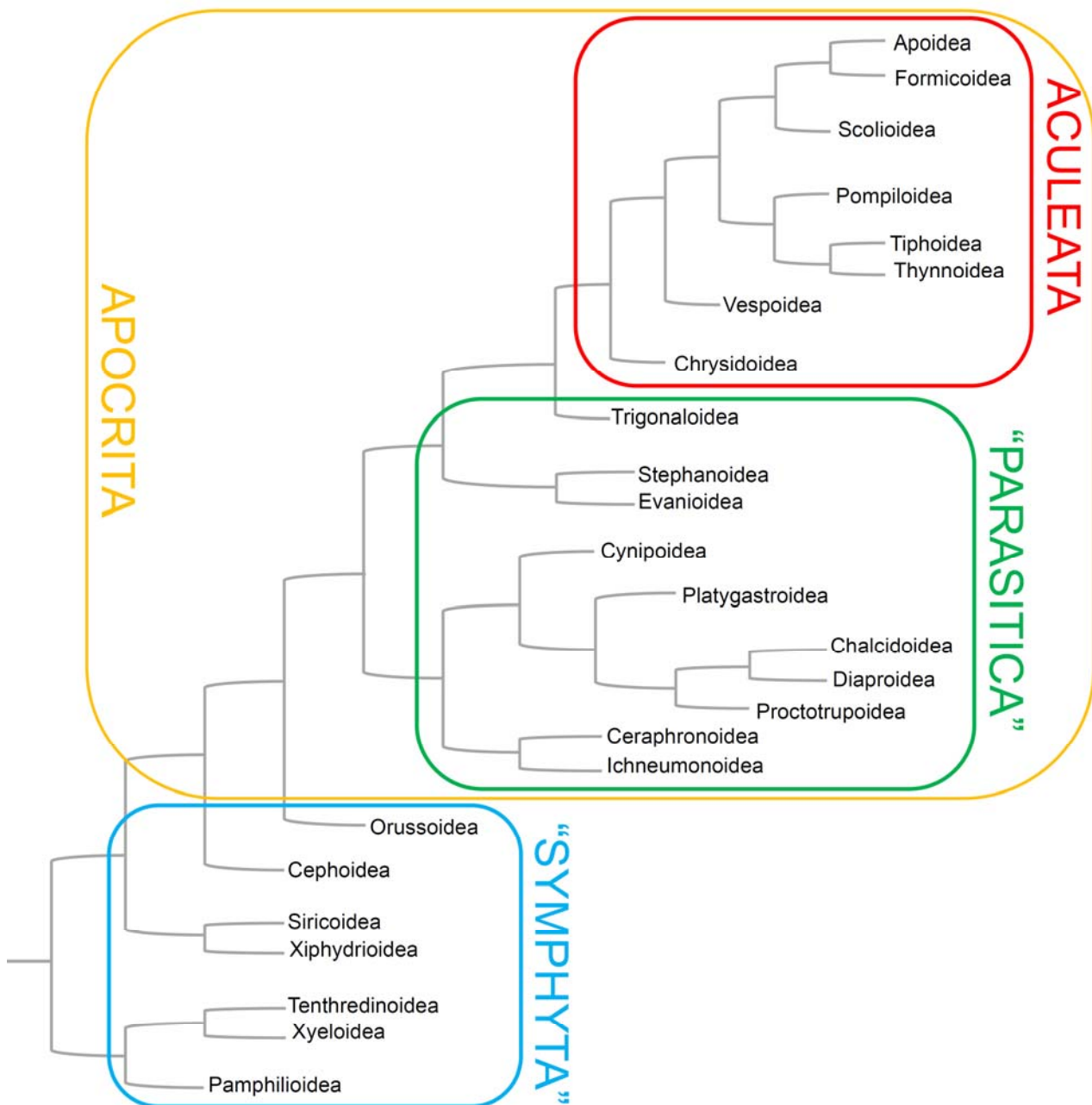


Fig. 2.1. Hipótesis filogenética reciente sobre la evolución de los linajes principales (superfamilias) del orden Hymenoptera, según las últimas reconstrucciones basadas en datos moleculares, fósiles, morfológicos, ecológicos y etológicos (ver texto). Árboles filogenéticos a mayor detalle (con relaciones entre linajes dentro de los géneros, familias y/o superfamilias) se han usado para los análisis que aparecen en los capítulos de los resultados y se presentan entonces directamente allí.

2.2.1. Suborden Symphyta

Aunque las relaciones filogenéticas entre el orden Hymenoptera han sido un tema de considerable y continuo debate, la clasificación se ha aceptado tradicionalmente dividida en dos subórdenes: “Symphyta” (Fig. 2.2) y Apocrita, este último a su vez subdividido en dos grupos, con categoría de infraorden o sección, dependiendo de los autores, denominados “Parasítica” (o también Terebrantes) y Aculeata (Sharkey & Nieves-Aldrey, 2014). En la historia de la clasificación del orden se han utilizado diferentes estimaciones específicas como el paso desde la fitofagia a la depredación o el parasitismo, la formación de la cintura de avispa, la evolución de un aguijón venenoso, la evolución de la eusociabilidad y el cambio que se produjo de la caza de presas a la recolección de polen. Estas transiciones evolutivas se encuentran parcialmente reflejadas en todos los árboles filogenéticos de Hymenoptera.

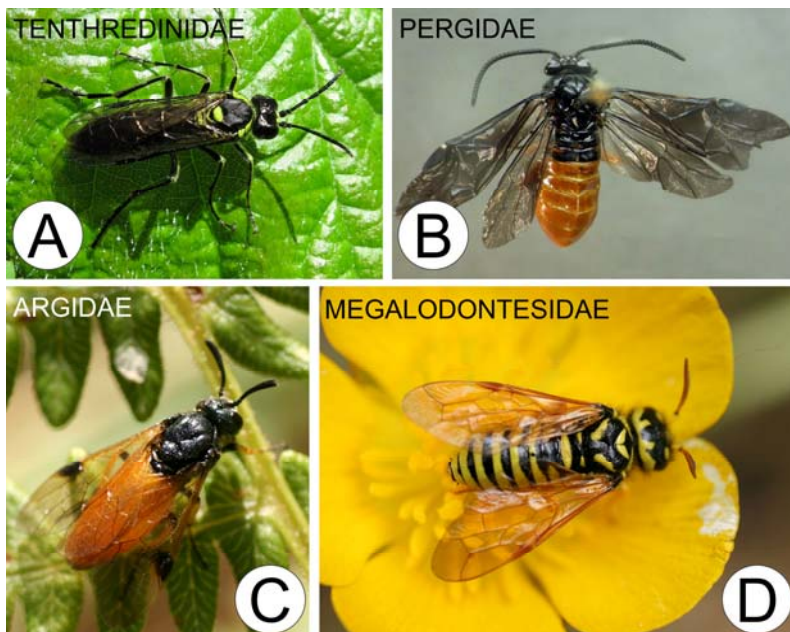


Fig. 2.2. Representantes de algunas de las familias de Symphyta. Autor: José Luis Nieves-Aldrey.

Las estimaciones más recientes indican que los himenópteros comenzaron a diversificarse entre el Carbonífero y el Triásico hace 281 millones de años (Peters *et al.*, 2017). Algunos estudios previos han sugerido que esta divergencia ocurrió entre el linaje Xyeloidea y el resto de Hymenoptera (Sharkey, 2007; Heraty *et al.*, 2011, Ronquist *et al.*, 2012; Sharkey *et al.*, 2012; Klopstein *et al.*, 2013; Malm & Nyman, 2015). Sin embargo, Peters *et al.* (2017), en una novedosa hipótesis filogenética, identifican un clado (Eusymphyta), que también contienen a Pamphilioidea y Tenthredinoidea, como parientes más cercanos de todos los restantes himenópteros (Unicalcarida). Estas superfamilias habían sido anteriormente reconocidas como un grupo parafilético por diferentes autores (Sharkey, 2007; Heraty *et al.*, 2011 Sharkey *et al.*, 2012; Malm & Nyman, 2015), en cambio, representan una radiación inesperada y no reconocida previamente de insectos ectófilos que comprende más de 7.000 especies descritas (Grimaldi & Engel, 2005) y que podrían influir significativamente en futuras investigaciones sobre las relaciones de los himenópteros.

De acuerdo con trabajos anteriores (Sharkey *et al.*, 2012; Klopstein *et al.*, 2013) donde encontraron un único origen en "Xyelidae", situándolo como el linaje más basal de Hymenoptera y reconociéndolo como grupo parafilético, hermano del resto de los himenópteros, otros especialistas reconocen, a partir de datos morfológicos, que Orussoidea (avispa parasitoides de larvas en la madera), el linaje "symphyto" más derivado, representa el pariente más cercano de los Apocrita (Sarkey & Nieves-Aldrey, 2014; Klopstein *et al.*, 2013; Vilhemsén *et al.*, 2010; Rasnitsyn & Quicke, 2002).

2.2.2. Suborden Apocrita

Los Apocrita, tradicionalmente llamados himenópteros mayores, son un grupo monofilético y caracterizados por exhibir la típica cintura de avispa. La evolución de la

cintura de la avispa, una constricción entre el primer y el segundo segmento abdominal llamado propodeo, supuso en gran medida una mejora de la maniobrabilidad de la sección trasera del abdomen, incluyendo el ovopositor, una gran innovación en la evolución de los himenópteros que, sin duda, contribuyó a la rápida diversificación de Apocrita (Vilhemsen *et al.*, 2010).

La práctica totalidad de los especialistas están de acuerdo en que los himenópteros Apocrita surgieron de un sínfito antecesor (Orthandra), con la función del ovopositor ancestral, dado que los Apocrita más primitivos actuales tienen un ovopositor barrenador, aunque existen discrepancias en cuanto a qué grupo concreto es el más cercano filogenéticamente. Se ha postulado que el grupo hermano de los Apocrita es el conjunto de Orussoidea y Cephoidea (Rasnitsyn, 1980; Gibson, 1985), pero en la actualidad la mayoría de las evidencias morfológicas existentes, basadas en los estudios del tórax (Gibson, 1985), la articulación de las coxas medias (Jhonson, 1988) y la estructura del metaposnoto (Whitfield *et al.*, 1989), señalan al primero de ellos como grupo hermano de los Apocrita (Gauld & Hanson, 1995b; Whitfield, 1998), integrando al segundo en el grupo monofilético de los Vespina (Heraty *et al.*, 2010; Sharkey *et al.*, 2012; Nieves-Aldrey & Sharkey, 2014).

2.2.2.1. Grupo Terebrantia

La división “Parasítica” (Fig. 2.3) engloba a los Apocrita principalmente parasitoides que no tienen aguijón, cuya sorprendente radiación probablemente se desencadenó por una mayor optimización y perfeccionamiento de rasgos relacionados con el estilo de vida parasitoide (por ejemplo, endoparasitismo y miniaturización), lo que permitió colonizar con éxito una gran variedad de nuevos nichos ecológicos. El grupo Parasítica es un grupo parafilético artificial de superfamilias que comprende la mayoría de la diversidad del orden Hymenoptera e incluye especies de comportamiento

generalmente parasitoide con el ovopositor adaptado para ser introducido dentro del cuerpo de sus huéspedes o dentro del substrato donde estos se encuentran si bien se pueden encontrar fitófagos, inductores de agallas (gallícolas o cecidógenos) o depredadores (LaSalle & Gauld, 1993).

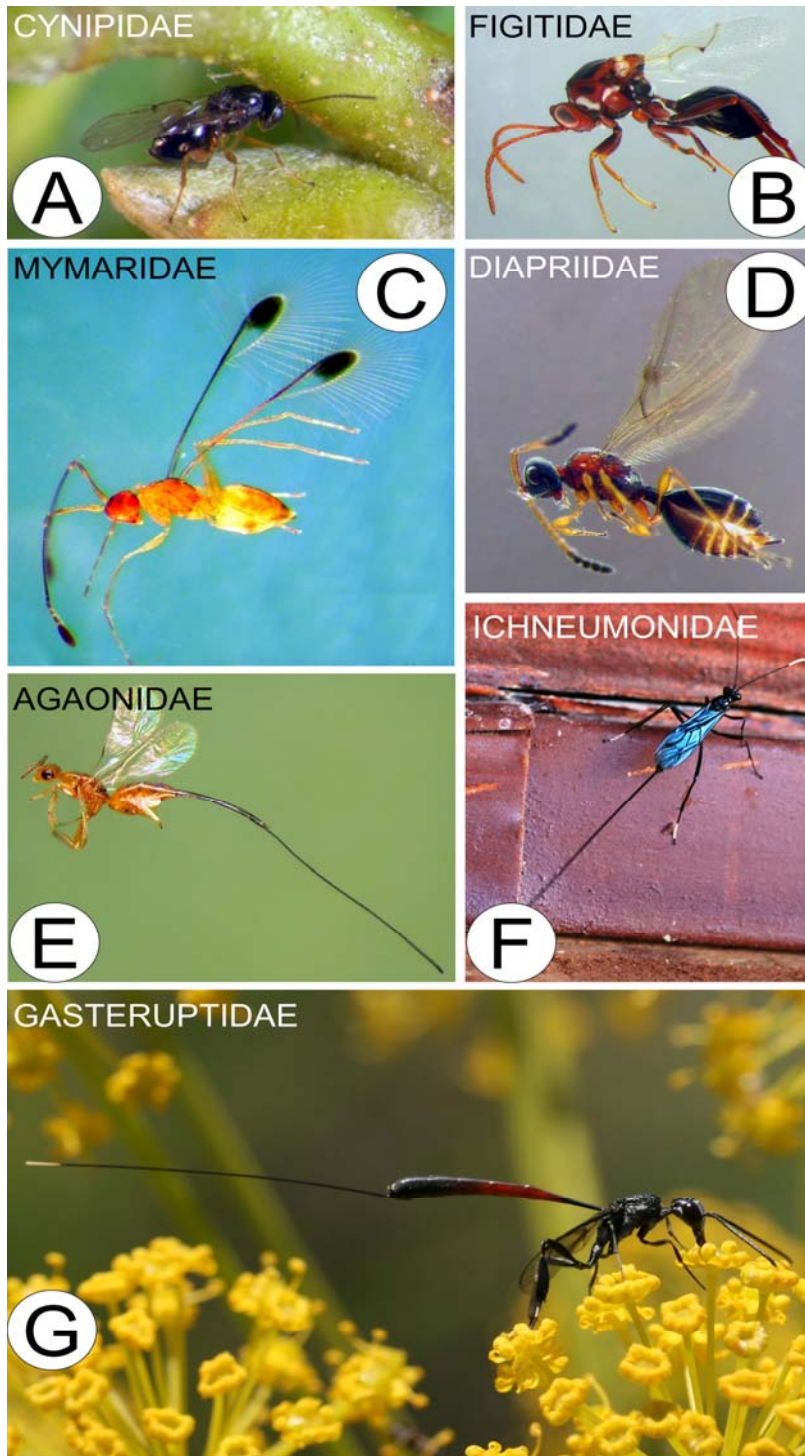


Fig. 2.3. Representantes de algunas de las familias de "Parasítica". Autor: José Luis Nieves-Aldrey.

El término parasitoide, *sensu stricto* (s. str.), define un grupo de organismos caracterizados por depositar sus huevos en el interior del hospedador, ya sea en fases inmaduras o adultas (endoparasitismo) o en las cercanías de los huevos, larvas o pupas, pertenecientes a las especies huéspedes (ectoparasitismo), de tal manera que, tras la emergencia de las larvas del parasitoide, estas devoran el organismo hospedador, e inalterablemente lo matan.

Se diferencian así de la mayoría de los parásitos, y a la vez se distinguen de los depredadores, en que solo necesitan una presa individual para completar su desarrollo (Quicke, 1997; Godfray, 1994; Askew & Shaw, 1986; Gauld & Bolton, 1988).

Basándonos en distintos aspectos de su Historia Natural y Etología, los parasitoides se pueden clasificar en varios grupos: solitarios o gregarios, parasitoides primarios o hiperparasitoides facultativos, obligados y cleptoparasitoides. En un sentido más amplio y teniendo en cuenta su rango trófico los parasitoides se pueden clasificar en monófagos cuando atacan exclusivamente a una especie de hospedador y polífagos cuando atacan a varios hospedadores distintos; por otra parte, los parasitoides pueden ser primarios o secundarios, según ataquen y alcancen todo su sustento exclusivamente de un único hospedador o se desarrollen sobre otro parasitoide, en cuyo caso se denominan hiperparásitos (Askew, 1980; Quicke, 1997; Nieves-Aldrey & Fontal, 1999). Sin embargo, la biología de los organismos parasitoides es tan compleja que en ocasiones resulta difícil categorizar el amplio rango etológico y sus complicados ciclos biológicos simplemente tomando como base su rango trófico.

Aunque la mayor parte de los grupos de himenópteros incluidos dentro de los Parasítica son parasitoides, hay también otros grupos que son fitófagos especializados en la inducción de agallas vegetales sobre las plantas. Entre todos ellos destaca el grupo de los cinípidos (Cynipoidea, Cynipidae) capaces de originar la formación de las

agallas estructuralmente más complejas. Los cinípidos efectúan la puesta de sus huevos dentro del substrato vegetal (como hojas, inflorescencias o tallos), seguido del desarrollo de estructuras morfológicas anormales de la planta, denominadas agallas o cecidias, que, siendo genéticamente controladas por las avispas en su propio beneficio, son parte de su fenotipo (fenotipo extendido) y pueden en muchos casos permitir su reconocimiento a nivel de especie (Nieves-Aldrey, 2001; Bailey *et al.*, 2009; Stone & Schönrogge, 2003).

Especialmente importante es la filogenia de nivel superior dentro de la superfamilia Chalcidoidea. La superfamilia es extremadamente diversa estimándose en 500.000 especies distribuidas en 22 familias, 268 géneros dentro de 78 de las 83 subfamilias, y su clasificación está muy presente en estudios recientes (Heraty *et al.*, 2012; Peters *et al.*, 2017). Hay consenso casi general en considerar al grupo monofilético, siendo Platygastroidea su grupo hermano. A la vez, se está poniendo de manifiesto que algunas de las familias tradicionales de Chalcidoidea no son monofiléticas. Este es el caso, por ejemplo, de los Aphelinidae que pueden ser parafiléticos respecto a los Signiphoridae o el caso de los Pteromalidae, (Hanson & Lasalle, 1995; Whitfield *et al.*, 1998) auténtico “cajón de sastre” de calcidoideos parasitoides que representan la fracción más importante en las complejas comunidades parasitoides asociadas a las cecidias de cinípidos y donde las especies del género *Mesopolobus* Westwood presentan gran protagonismo. Las larvas de estas especies son ectofágicas y se nutren sobre las larvas, pupas o incluso adultos de otros pobladores de las agallas (Askew, 1961).

2.2.2.1.1. Superfamilia Cynipoidea

Los cinipoideos constituyen una de las principales superfamilias de himenópteros incluidas en la sección Parasítica del suborden Apocrita. Con 240 géneros y más de

3.000 especies descritas es, después de Ichneumonoidea, Chacidoidea y Proctotrupeoidea (*sensu lato*), el grupo de himenópteros parásitos más rico en especies a nivel global (LaSalle & Gauld, 1991, 1993; Gaston, 1992; Nieves-Aldrey, 2001; Aguiar *et al.*, 2013; Ronquist *et al.*, 2015). Siguiendo la más reciente clasificación (Aguiar *et al.*, 2013; Nieves-Aldrey & Sharkey, 2014; Ronquist *et al.*, 2015) se admite que la superfamilia engloba cinco familias actuales que son, hasta donde se conoce, monofiléticas: Austrocynipidae, Liopteridae, Iballidae, Cynipidae y Figitidae, de las que solo las tres últimas están representadas en la fauna ibero-balear.

Los cinipoideos son insectos de pequeño a mediano tamaño, generalmente de 1 a 6 mm de longitud, aunque excepcionalmente algunos representantes de las familias Iballidae y Liopteridae pueden superar los 20 mm. Se trata de insectos que, aunque tienen el cuerpo generalmente ornamentado con diferentes tipos de escultura, presentan colores por lo general apagados, negros, rojizos, ambarinos o castaños, brillantes o mates, pero nunca con las tonalidades metálicas que presentan otros himenópteros como los calcídidos o los crisídidos.

Los especialistas refieren que la primitiva evolución y radiación de los Cynipoidea tuvo lugar probablemente en asociación con alguna comunidad de insectos con larvas taladradoras de tallos y madera de plantas leñosas como la de las coníferas. De hecho, los grupos considerados más primitivos (Austrocynipidae, Iballidae y Liopteridae (macrocinipoides), son parasitoides de larvas xilófagas de insectos.

Los microcinipoides es el otro gran grupo de cinipoideos que agrupa insectos de menor talla (hasta 5mm de longitud) y que pertenecen a dos grupos tróficos muy distintos: el primero lo compone insectos fitófagos inductores de agallas e inquilinos que quedan integrados en la familia Cynipidae, mientras que el segundo lo constituye

los parasitoides de otros himenópteros, neurópteros o dípteros, y se encuentran dentro de la familia Figitidae.

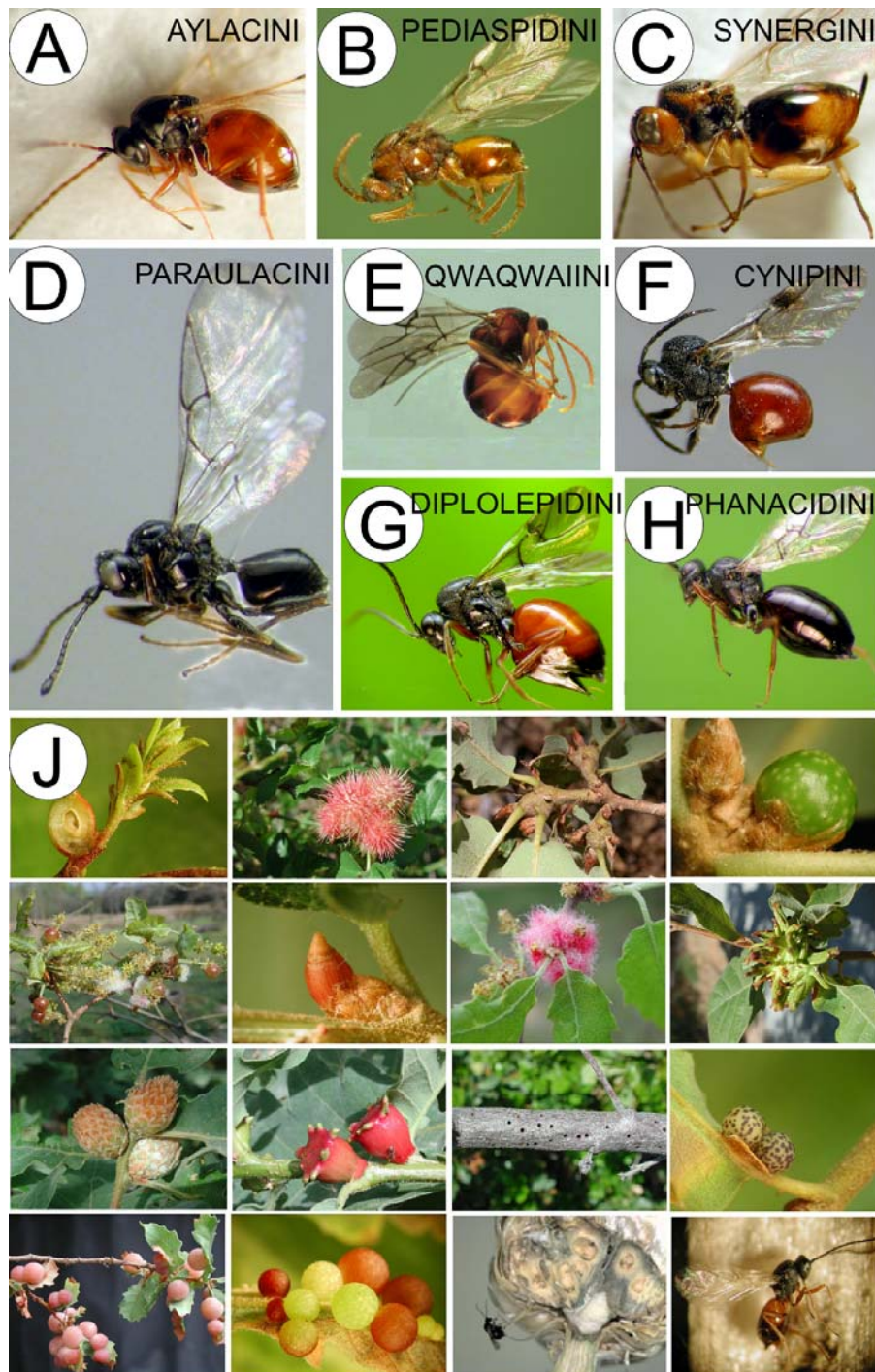


Fig. 2.4. Representantes de algunas de las tribus de Cynipidae (A-H) y variabilidad de las agallas en los Cynipidae (J). Autor: José Luis Nieves-Aldrey.

Ronquist (1999) planteó que el origen evolutivo de los microcinipoides fuera una especie ancestral parasitoide de una larva, posiblemente de calcídido de hábitat gallícola. Posteriormente, una línea filogenética evolucionaría hasta dar los cinípidos gallícolas y otra seguiría siendo parásita, pero colonizando nuevos hábitats, y daría lugar a los microcinipoides parasitoides, fundamentalmente parasitoides primarios de larvas de dípteros, homópteros, neurópteros y coleópteros (Buffington *et al.*, 2012; Ronquist *et al.*, 2015). La familia Cynipidae (Fig. 2.4) representa la radiación más espectacular de todos los insectos con capacidad de inducir la formación de agallas vegetales. Además de insectos gallícolas o verdaderos inductores de cecidias, el grupo incluye también fitófagos inquilinos, que son cinípidos que viven como inquilinos obligados en las agallas de otros cinípidos y, recientemente, se ha visto que puede incluir también parasitoides de agallas de calcidoideos (Ronquist *et al.*, 2015).

2.2.2.2. Grupo Aculeata

Bajo la denominación Aculeata (Fig. 2.5), nombre derivado del latín *aculeus* (espada) referido a la presencia de un aguijón que es un ovopositor modificado, y conocidos tradicionalmente como himenópteros superiores por agrupar a los himenópteros de mayor talla, algunos de los cuales forman sociedades complejas y por estar morfológicamente caracterizados por el típico estrechamiento entre tórax y abdomen (cintura de avispa), se agrupan una gran diversidad de himenópteros que presentan un origen evolutivo común (Brothers, 1975; Carpenter, 1986; Gauld & Bolton, 1988; Goulet & Huber, 1993; Brothers y Carpenter, 1993; Hanson & Gauld, 1995). Este origen se ha demostrado por la presencia en todos los aculeados de una característica diagnóstica clara y que apareció solo una vez a lo largo de la evolución del grupo: el ovopositor de la hembra se transforma en un aguijón que inyecta veneno

en sus presas o como defensa ante los depredadores y no para la puesta de los huevos, los cuales, se ponen desde una apertura en los últimos segmentos del abdomen a través de la abertura vaginal.

La diversificación de los Aculeata ocurrió hace 190 millones de años (Peters *et al.*, 2017) y los crisídidos (Chrysididae) es el grupo hermano de todos los Aculeata restantes (Brothers, 1999).

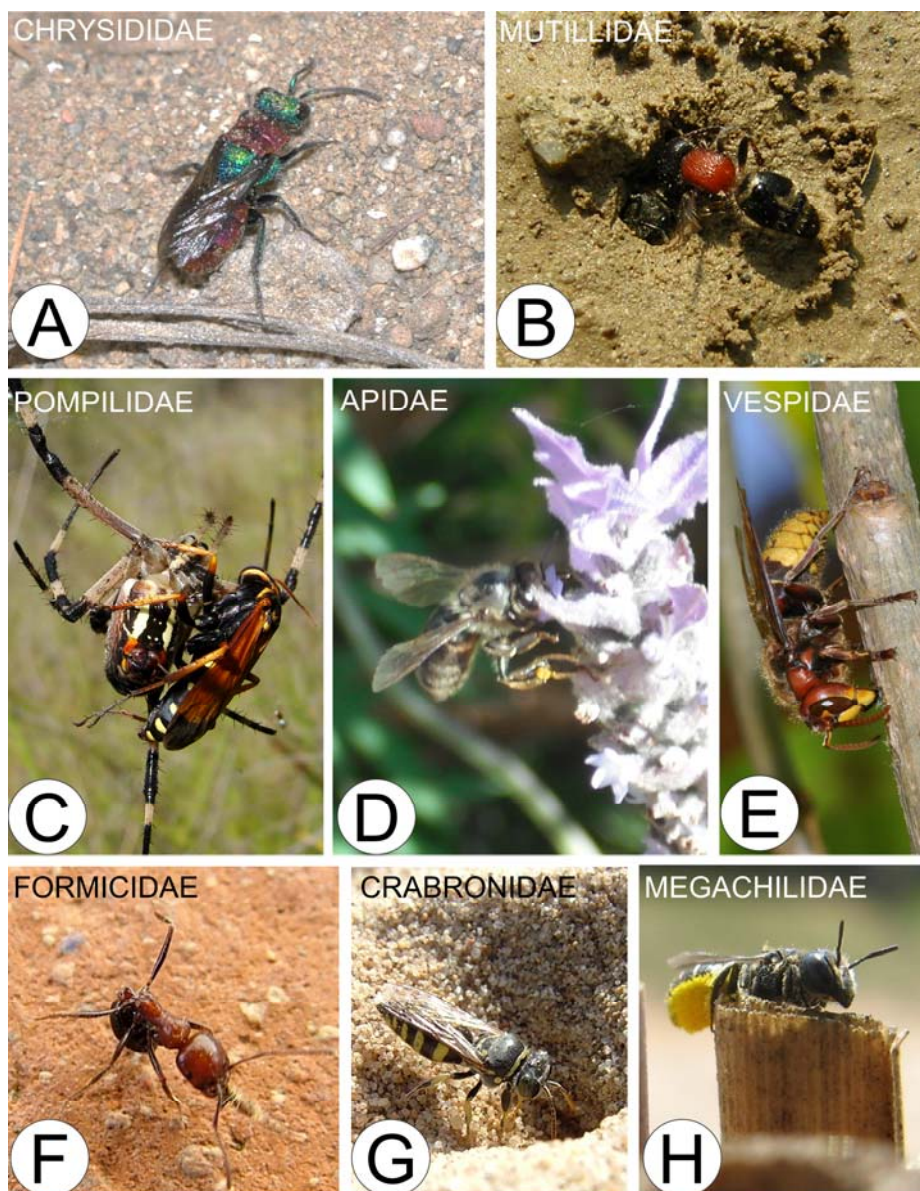


Fig. 2.5. Representantes de algunas de las familias de Aculeata. Autor: Carlo Polidori.

El grupo incluye hormigas, abejas y diversos tipos de avispas parásitas y depredadoras y también a todos los himenópteros sociales. Entre los Aculeata, las larvas se alimentan bien de presas vivas y paralizadas, o muertas, bien de polen y néctar, bien de semillas u hongos e incluso de huevos no viables (hormigas y ciertas abejas). A pesar de las grandes diferencias entre los hábitos alimenticios de la larva (polen y néctar frente a presas) de las abejas y las avispas aculeadas, hay muchos puntos de su biología, sobre todo los relacionados con su tipo de nidificación, que son compartidos por ambos grupos (Gauld & Bolton, 1988; Michener, 2007).

A pesar de ser un grupo considerado actualmente como monofilético, la clasificación de los aculeados presenta poco consenso entre los especialistas. En general se reconocen tres superfamilias: Chrysidoidea, Vespoidea y Apoidea. La superfamilia Chrysidoidea presenta una relación de grupo hermano con el clado formado por las superfamilias Apoidea + Vespoidea (Brothers, 1999; Peters *et al.*, 2017). La superfamilia Vespoidea se reconoce como de naturaleza artificial (Sharkey, 2007) Es en Apoidea donde surgen las mayores controversias con las relaciones filogenéticas, sin duda como consecuencia de que es la superfamilia donde existe la mayor diversidad de aculeados.

2.2.2.2.1. Superfamilia Apoidea

Los Apoidea (Fig. 2.6) representan un grupo numeroso de himenópteros aculeados que podría alcanzar un número próximo a las 1.500 especies en la fauna ibérica, según Ortiz-Sánchez (2006). El grupo incluye avispas depredadoras y las abejas, que usan polen como fuente de proteínas para las larvas (la excepción la encontramos en un pequeño grupo de meliponinos del género *Trigona* (Jurine, 1807), que usan carroña en vez de polen. En consecuencia, las hembras de casi todos los

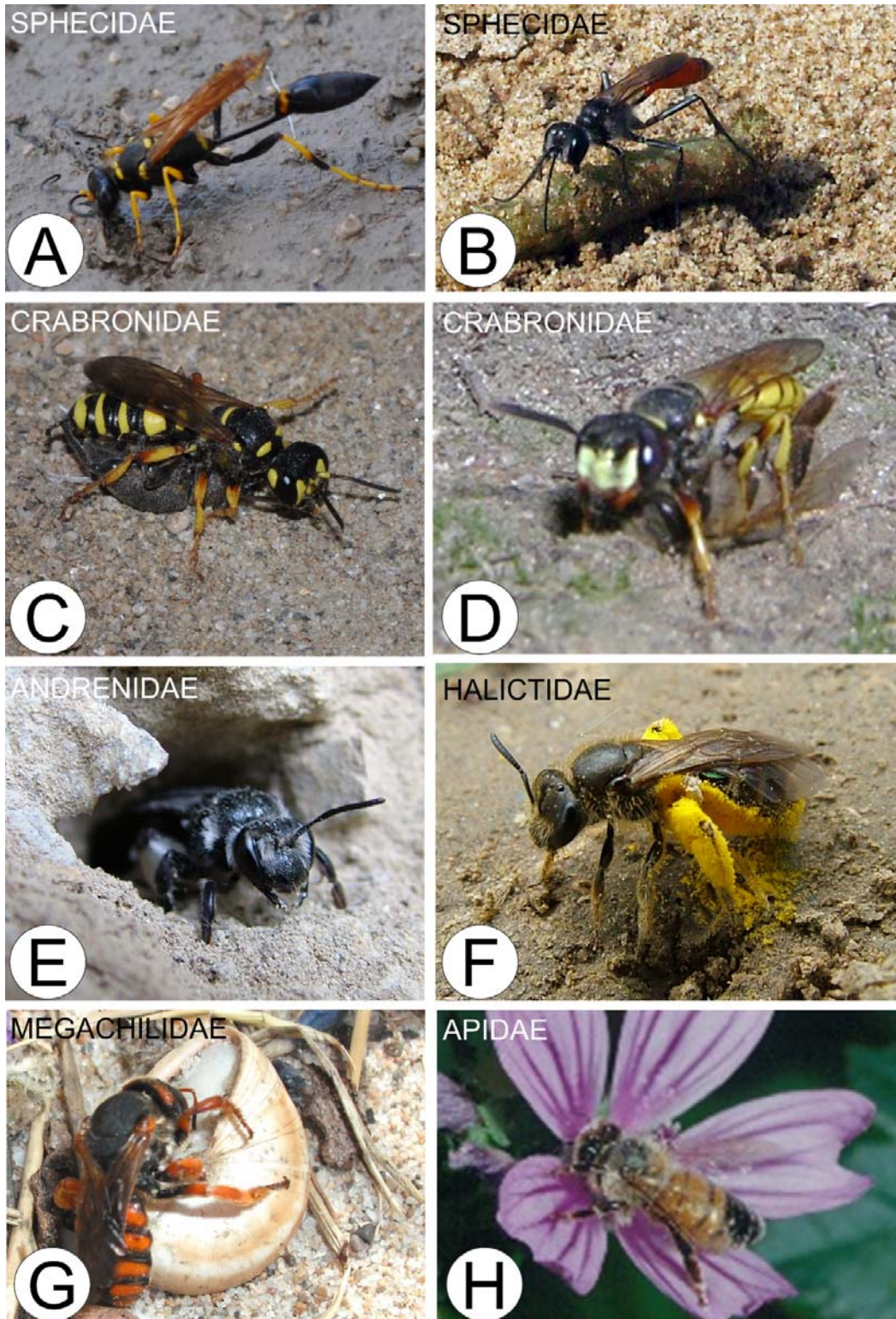


Fig. 2.6. Representantes de algunas de las familias de Apoidea. Autor: Carlo Poldori.

grupos poseen unas estructuras especiales mediante las que recolectan polen, lo compactan y lo transportan (Ornosa & Ortiz-Sánchez, 2004).

La forma de vida más común es la solitaria, aunque el comportamiento social ha aparecido tan frecuentemente que supone una conquista evolutiva muy importante. De este modo, podemos encontrar en la superfamilia todos los grados de comportamiento y organización social descritos para los insectos. Igualmente, aparece el parasitismo social y el cleptoparasitismo (Michener, 1974; Wilson, 1971) con un 85% de las especies descubiertas hasta ahora (Michener, 2007). La gran mayoría de los Apoidea presentan una sola generación anual, caracterizándose por construir un nido (Fig. 2.7) y almacenar comida para su prole en solitario. No obstante, el comportamiento más complejo es el eusocial que, entre los insectos, está presente en las abejas y avispas de organización social más elaborada, pero también en las hormigas y en todas las termitas, entre otros. Para que exista eusociabilidad deben darse varios requisitos como son la coexistencia de dos generaciones en el mismo nido (madre e hijas), la división del trabajo (una reina pone huevos y el resto son obreras que abastecen el nido) y la existencia de castas (Michener, 2007).

Los estudios filogenómicos más recientes (Johnson *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2017) determinan que las hormigas (Formicoidea) son los parientes más cercanos existentes de Apoidea y se estima que el origen filogenético de las abejas (Anthophila) está en la familia de avispas Crabronidae, concretamente la tribu Psenini. Este resultado corrobora la idea de que el cambio de la predación a la fitofagia como estrategia de vida ha sido clave en la tremenda diversificación de las abejas (Cardinal & Danforth, 2013). El trabajo de Peters y colaboradores (2007) estima que el origen de las abejas ocurre en el Cretácico, aproximadamente entre 147 y 93 millones de años, un resultado que se deduce consistente si tenemos en cuenta la existencia de un vínculo

temporal entre las diversificaciones de las abejas y las angiospermas (Cardinal & Danforth, 2013).

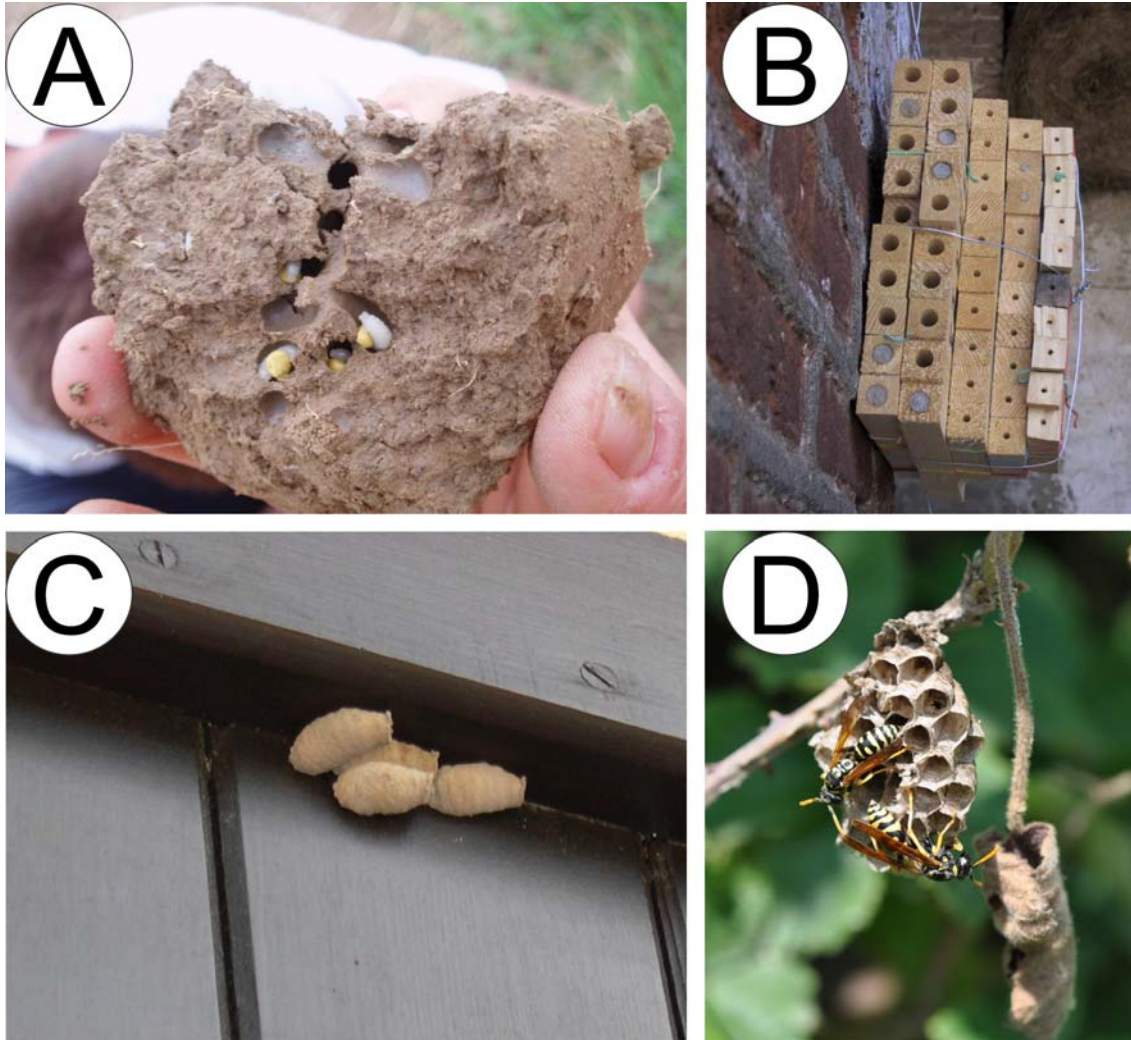


Fig. 2.7. Algunos tipos de nidos de los himenópteros aculeados. A: nido subterráneo de una abeja excavadora (se notan las celdas de cría, algunas con larvas y polen). B: nidos en cavidades pre-existentes usados por varias especies de abejas y avispas solitarias (se observan algunos nidos con tapón de barro, señal de su completo aprovisionamiento). C: nido de barro aéreo de una avispa solitaria. D: nido de cartón de avispas sociales (se observan unas hembras). Autor: Carlo Polidori.

2.3. Ecomorfología en los Hymenoptera

El pensamiento darwiniano proyectó la convicción de que la diversidad biológica evolucionó a través de una combinación de procesos genealógicos y ambientales.

Aunque hoy día los biólogos aceptan esta idea, en la práctica muchos de los estudios filogenéticos y ecológicos se llevan a cabo de manera independiente. Esto es un problema, ya que para dar explicaciones evolutivas se requiere como referencia tanto la reconstrucción de las relaciones filogenéticas del grupo bajo estudio, como la del conocimiento del medio donde ha evolucionado (Schluter & Losos, 2000; Brooks & McLennan, 2002). Es por tanto necesario que en los programas de investigación se integre la información morfológica, ecológica y comportamental, con la información histórica sobre los organismos que se estudian, para producir una imagen más robusta de la evolución.

La vida de los organismos podría considerarse como el transcurso continuativo de procesos y cambios morfológicos, fisiológicos, ecológicos y evolutivos que determinarán su contribución genética a las futuras generaciones, o, en otras palabras, su eficacia biológica (Klemming, 2002). Cualquier persona que se haya ocupado en conocer la historia natural de los modos de vida de los animales habrá podido comprobar que estos varían en sus estrategias vitales moldeadas por la selección natural. La teoría evolutiva predice que las estrategias vitales han debido ser seleccionadas para maximizar la eficacia biológica de los organismos. La duración de las etapas juvenil y adulta, la duración e intensidad del crecimiento, el inicio del envejecimiento, o la secuencia temporal de sucesos y procesos como la reproducción, la adquisición y distribución de recursos o la dispersión a nuevos lugares son características de cada especie, población o individuo, cuyas consecuencias se dejan sentir en el éxito reproductor y que por tanto tienen implicaciones evolutivas. Bajo la

hipótesis de que la reproducción es fisiológicamente costosa, surge la teoría de las estrategias vitales ("*Life history theory*") un campo que penetra en cualquier aspecto de la Biología de Poblaciones y de la Ecología del Comportamiento y representa una buena parte de la Ecología Evolutiva, que pretende dar énfasis a la multiplicidad de opciones que se ofrecen a los individuos en muchos momentos de la vida, y cuya "elección" tendrá consecuencias a largo plazo. Estas múltiples opciones están circunscritas al marco que la morfología, fisiología, genética, del desarrollo y filogenética de la especie (Braendle *et al.*, 2011; Selman *et al.*, 2012), basadas en su historia evolutiva, permiten. La teoría sobre la Evolución de Estrategias Vitales intenta, además, determinar las estrategias vitales óptimas en determinadas circunstancias por medio de modelos de optimización, modelos que se fundamentan en la existencia de interacciones y compromisos entre distintos rasgos (*trade-offs*) y las constricciones o limitaciones (*constraints*) genéticas, filogenéticas, fisiológicas, mecánicas y ecológicas que afectan a los mismos (Roff, 1992).

Al relacionar las estrategias vitales de las distintas especies con la importancia adaptativa de ciertas características morfológicas y con factores ecológicos (hábitat, dieta, estructura social, etc.), puede discernirse cómo la Selección Natural puede haberlas moldeado.

Entre las variadas estrategias y comportamientos de los himenópteros Apocrita parasitoides se han estudiado profusamente el endoparasitismo y el ectoparasitismo, el parasitismo solitario o gregario, la estrategia idiobionte o cenobionte (Askew & Shaw, 1986), el cleptoparasitismo y el hiperparasitismo. Los parasitoides han desarrollado adaptaciones asombrosas para localizar a sus presas, incluso si estas viven en el interior de galerías excavadas en troncos de madera. Por ejemplo, las hembras del Ichneumónido *Ephialtes* (Gravenhorst, 1829) tienen un ovopositor de casi 6 cm de longitud. Muchos parasitoides inoculan virus en sus hospedadores con el fin

de destruir su sistema inmunitario (Stoltz & Vinson, 1979). Las hembras adultas de muchas de las líneas basales de los Apocritos son capaces de usar veneno para paralizar temporal o permanentemente al hospedador.

En particular, la historia natural de la familia Cynipidae es rica, compleja y, desde, distintos puntos de vista, fascinante también. Los mecanismos de la formación de las agallas y el estudio de su variada morfología, los procesos de coespeciación o de coevolución con las plantas hospedantes, los peculiares ciclos biológicos de las especies o el estudio de las complejas comunidades de insectos asociadas a las agallas de cinípidos son solo algunas de las múltiples facetas de interés que ofrece los modos de vida de este grupo de himenópteros.

Desde una perspectiva ecológica y haciendo uso de la morfología del animal, se puede analizar la relación ecológica entre las especies y la posición que ocupan en la comunidad, a través de una disciplina reciente conocida como Ecomorfología (Ricklefs & Miles, 1994). La Ecomorfología se ocupa de las interacciones entre las características morfológicas de los organismos individuales y las demandas selectivas de su entorno externo, y sus consecuencias para posteriormente analizar datos morfológicos, ecológicos y evolutivos. Aunque como disciplina biológica se consolida en la década de los setenta del s. XX, puede considerarse que el marco teórico puede fecharse un siglo antes, cuando en 1859 Darwin publica su "Origen de las Especies" donde destaca en varias ocasiones, y se cita textualmente, los "...numerosos ejemplos de semejanzas sorprendentes, en seres completamente distintos, entre órganos o partes determinados, que se han adaptado a las mismas funciones". El verdadero comienzo de la Ecomorfología vino sólo después de la síntesis moderna de la teoría de la evolución (1937-1948) y los fundamentos de una morfología funcional experimental en los años cincuenta.

Durante la primera mitad de este siglo fueron numerosos los autores (p.ej. Burt, 1930; Bóker, 1935,1937; Engels, 1940; Richardson, 1942; Van der Klaauw, 1948; Bock & Von Wahlert, 1965) cuya investigación se dirigió precisamente a esto: poner de manifiesto adaptaciones morfológicas. Muchos han sido los trabajos ecomorfológicos de vertebrados publicados durante los años setenta y ochenta (p. ej. Karr & James, 1975; Ricklefs & Cox, 1977; Leisler, 1980; Wiens & Rotenberry, 1980; Nierni, 1985; MacNally & Doolan, 1986; Pianka, 1986; Schaefer & Lauder 1986, Bennett 1987, Donoghue, 1989; Carrascal *et al.*, 1989). En general todos han pretendido poner de manifiesto, aceptando el axioma de que morfología y ecología están relacionadas, el valor predictivo que su ecología tiene en el diseño de un organismo o viceversa (Barbosa & Moreno, 1994)

Un objetivo principal en Ecomorfología es encontrar explicaciones adaptativas para formas específicas (especializaciones), es decir, considerar el entorno externo como la principal causa evolutiva de la morfología observada. Por ejemplo, entre los insectos herbívoros, la morfología del tarso a menudo se especializa para su uso en tipos particulares de superficies de plantas (Kennedy, 1986; Betz, 2002). Las especializaciones morfológicas de los himenópteros son relevantes porque se encuentran relacionadas con aspectos ecológicos, evolutivos y comportamentales como el vuelo, alimentación, reproducción, comunicación, comportamiento de forrajeo y la selección del hábitat y la biometría de estas permite su caracterización hasta determinar la posición que ocupan dentro del espacio ecológico.

Si los estudios ecomorfológicos pretenden demostrar “adaptación” no deberían perder de vista la posibilidad de que semejanzas en morfologías puedan ser debidas a historia común. La necesidad de encuadrar los estudios ecomorfológicos en un contexto evolutivo ha sido puesta de manifiesto en la década de los noventa (Lauder, 1990, 1991; Losos, 1990a, 1990b; Wikramanayake, 1990; Wainwright, 1991;

Winemiller, 1991; Moreno & Carrascal 1993, 1994). Sin embargo, para facilitar la inclusión de esta componente evolutiva en ecomorfología y así evitar obtener patrones ecomorfológicos denominados espurios (Losos, 1990b), debemos incluirlos en un marco filogenético apropiado eliminando el efecto de la no independencia estadística de las especies filogenéticamente emparentadas (Harvey & Pagel, 1991).



*"No se pasa de lo posible a lo real,
sino de lo imposible a lo verdadero".*

María Zambrano

III

Objetivos

En esta memoria se investiga cómo afecta a la morfología de los Hymenoptera la variabilidad en su conducta de búsqueda del alimento, hábitos reproductivos y a su comunicación visual y/o química. En particular, se han estudiado la estructura de las mandíbulas, la morfología de las antenas y la bioquímica de la coloración en la cutícula y pubescencia. Se han utilizado especies seleccionadas de Hymenoptera en clave comparativa. Los estudios comparados representan, junto con los estudios experimentales de laboratorio, la base empírica para inferir o verificar patrones evolutivos generales (Harvey & Pagel, 1991). Normalmente las especies son comparadas morfológica y ecológicamente, definiéndose así patrones que surgen de la existencia de relaciones estadísticamente significativas entre los caracteres estudiados. A continuación, se exponen las hipótesis de partida a investigar en este estudio y los objetivos propuestos para tal fin.

Hipótesis 1: De los estudios pioneros de Pryor (1940) sobre la base química de esclerotización a los análisis más recientes sobre incorporación de compuestos fenólicos y química de hidrocarburos en la epicutícula (Andersen, 2010; Blomquist & Bagnères, 2010), se ha hecho un gran esfuerzo para arrojar luz sobre la estructura y composición de la cutícula de insectos y sus relaciones con los diferentes rasgos de sus ciclos de vida. Especialmente en los últimos 20 años, muchos investigadores se han centrado en el conocimiento sobre la incorporación de metales de transición como cinc (Zn), cobre (Cu), manganeso (Mn), hierro (Fe) y halógenos en ciertos órganos como mandíbulas, ovoposidores y quelíceros (Schofield & Lefevre, 1989; Quicke *et al.*, 1998; Schofield *et al.*, 2002; Lichtenegger *et al.*, 2003; Polidori *et al.*, 2013). Estudios comparativos sugieren que el enriquecimiento de metales en la cutícula es beneficioso para organismos con ciertas biología. La inclusión de Zn en las mandíbulas y ovoposidores de insectos afecta a su dureza y tiene una importante función durante la

alimentación o la reproducción. De hecho, las especies que no se reproducen o alimentan en sustratos duros tienden a carecer de estos metales, mientras que especies estrechamente relacionadas con la actividad prolongada de cortar o perforar sustratos duros durante su vida presentan tales metales (Cribb *et al.*, 2008a; Morgan *et al.*, 2003; Polidori *et al.*, 2013; Kundanati & Gundiah, 2014). Sin embargo, se sabe poco sobre la base química / estructural del enriquecimiento de Zn en el orden Hymenoptera.

Hipótesis: La presencia de Zn en las mandíbulas está relacionada con cambios estructurales de las mismas, y que la variación en la abundancia de Zn determina tales variaciones estructurales.

- **Objetivo.** Realizar una nueva aproximación metodológica mediante técnicas no destructivas (SEM-EDS-CL) que ayude a revelar la base química y estructural del enriquecimiento por Zn en las mandíbulas (Fig. 3.1), para lo cual se han seleccionado hembras de un total de 11 especies en 10 familias con diferentes rasgos ecológicos. Se compararán los resultados con los obtenidos para cinco minerales en el que el Zn se presenta con diferentes relaciones estequiométricas y distinta estructura cristalina

ESTE ESTUDIO SE ENCUENTRA DETALLADO EN EL CAPITULO I DE LOS RESULTADOS.

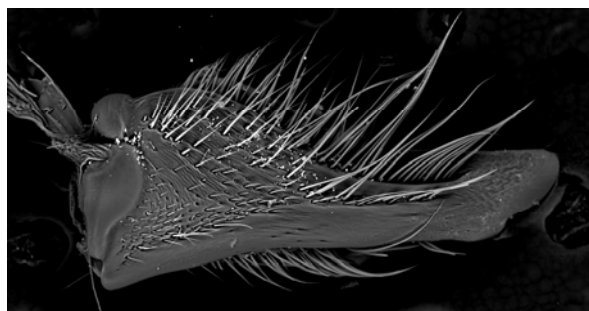


Fig. 3.1. Ejemplo de mandíbula de un himenóptero (Apidae; foto SEM) (autor: Alberto Jorge).

Hipótesis 2: A pesar de tener una estructura común, la cutícula de los artrópodos es muy variable en términos de composición química, espesor y propiedades mecánicas, tales como rigidez y elasticidad. De acuerdo con trabajos publicados en himenópteros (p. ej. Polidori *et al.*, 2013), la presencia de metales en el ovopositor parece estar relacionada con la dureza del sustrato de ovoposición. Sin embargo, la presencia de metales en las mandíbulas, otra estructura importante que actúa sobre sustratos con dureza variables, parece ser un rasgo más conservado dentro de las diversas familias de himenópteros (Quick *et al.*, 1998; Polidori *et al.*, 2013). Es posible entonces que para apreciar la variabilidad en este rasgo e intentar asociarlo con la biología de las especies, haya que enfocar el trabajo sobre una amplia base comparativa que incluya la mayor parte de las familias conocidas. Trabajos previos basados en un número limitado de familias solo demuestran que en determinados linajes hay ausencia de metales (Quick *et al.*, 1998), pero un cuadro exhaustivo y comparativo dentro del orden no ha sido todavía propuesto.

Hipótesis: La presencia de Zn y Mn será más probable y sus abundancias serán mayores en las especies que utilizan las mandíbulas para cortar sustratos más duros, y que en consecuencia exista un limitado efecto del ancestro común sobre estos patrones.

- **Objetivo.** Estudiar exhaustivamente, y de forma comparativa por técnicas no destructivas (SEM-EDS), la incorporación de Zn y Mn en las mandíbulas (Fig. 3.2) de 87 especies del orden Hymenoptera que abarcan 64 familias y 21 superfamilias, para probar el efecto de sus rasgos ecológicos (sustrato de emergencia del adulto, dieta de la larva y modo de alimentación adulta) sobre la variación en la presencia y abundancia de estos metales. Los resultados se mapearán sobre las últimas filogenias disponibles para el orden, con el

propósito de vislumbrar también posibles tendencias filogenéticas en los patrones de acumulación de estos metales.

ESTE ESTUDIO SE ENCUENTRA DETALLADO EN EL CAPITULO II DE LOS RESULTADOS

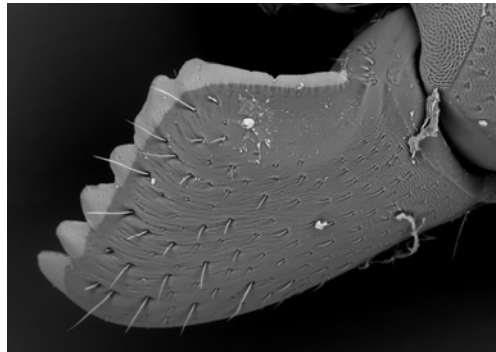


Fig. 3.2. Ejemplo de mandíbula de un himenóptero (Formicidae; foto SEM) (autor: Alberto Jorge).

Hipótesis 3: La comunicación intersexual que involucra señales visuales, basada en pigmentos, es conocida sobre todo en la dinámica de elección de pareja, tanto en vertebrados como en invertebrados (Andersson, 1994). De hecho, los machos y las hembras a menudo se distinguen por las características sexuales secundarias, cifradas en los patrones de pigmentación, algunos de los cuales han evolucionado a través de la selección sexual (Darwin, 1871). En particular, la selección intersexual se expresa en variados "adornos", que consisten en características morfológicas exageradas, y donde la pigmentación juega un papel importante en el canal de comunicación visual (Jawor & Breitwisch, 2003; Roulin, 2004). Concretamente, en los Pteromalidae (Hymenoptera), una familia de avispas parasitoides que incluye cerca de 3.500 especies en casi 600 géneros (Noyes, 2003; Aguiar *et al.*, 2013), se conoce desde hace tiempo que los machos de algunas de sus especies muestran un amplio rango de caracteres sexuales secundarios, incluyendo diferentes patrones de colores, especialmente en las patas y las antenas (Askew, 1971; Graham, 1969; Mitroiu, 2010), que exhiben durante el cortejo en la elección de la hembra. Sin embargo, no se

conoce todavía la base química de estos patrones de pigmentación. En los animales, junto con varios otros tipos de pigmentos, hay dos tipos de melaninas que determinan los colores, la eumelanina y la feomelanina (Riley, 1997; Nosanchuk & Casadevall 2006; Gao & Garcia-Pichel, 2011; Eisenman & Casadevall, 2012; Schneider *et al.*, 2012; Eliason *et al.*, 2013). Las melaninas son polímeros heterogéneos derivados de la oxidación de fenoles y posterior polimerización de fenoles intermedios y sus quinonas resultantes (Ito *et al.*, 2011). Hasta ahora, en invertebrados, la feomelanina ha sido observada solo en una especie de ortópteros y una de lepidópteros (Galván *et al.*, 2015), pero podría ser más generalizada en los insectos de lo que se cree hasta el momento.

Hipótesis: La coloración de las patas y antenas de los pteromalidos (rasgos sexuales secundarios) puede que esté influida por la presencia de los dos tipos mayoritarios de melaninas, el negro asociado a eumelanina y los colores más claros asociados a feomelanina, como ocurre en otros animales (Riddle, 1909; Simon & Peles, 2010; García-Borrón & Olivares Sánchez, 2011).

- **Objetivo.** Identificar y caracterizar posibles melaninas, mediante Espectroscopía Raman, implicadas en el patrón de color de las antenas y de unas áreas pigmentadas en las tibias (Fig. 3.3), de machos de avispas parasitoides de tres especies pertenecientes al género *Mesopolobus*, como adaptación bioquímica al reconocimiento por parte de las hembras durante el cortejo.

ESTE ESTUDIO SE ENCUENTRA DETALLADO EN EL CAPITULO III DE LOS RESULTADOS.



Fig. 3.3. Ejemplo de tibia con pigmentación de un himenóptero (Pteromalidae) (foto Estereomicroscopio) (autor: José Luis Nieves-Aldrey).

Hipótesis 4: Uno de los rasgos distintivos de la variación fenotípica de las abejas es ciertamente la coloración. Como se ha apuntado anteriormente, los pigmentos biológicos más prevalentes en los insectos, como en la mayoría de los organismos vivos, son melaninas, aunque en los insectos hay muy poca evidencia de la presencia de sus dos tipos principales (eumelanina y feomelanina). El género *Bombus* (Latreille, 1802) (Apidae) conocido por el nombre genérico de abejorro o moscardón, en común con muchos otros animales tóxicos o venenosos, exhiben gamas y patrones de color aposemáticos, claramente característicos y visibles por sus coloraciones llamativas (Plowright & Owen, 1980; Goulson, 2003; Williams, 2007). Típicamente, estos patrones tienen alto contraste entre bandas de colores resonantes y brillantes, incluyendo amarillos, blancos, naranjas o rojos y regiones de negros en segmentos corporales de su tórax y / o abdomen. Las diferencias y similitudes en los patrones de color son bien conocidas entre y dentro de las especies de abejorros (Dalla Torre, 1880; Vogt, 1911; Ornosá & Ortiz-Sánchez, 2004; Rapti *et al.*, 2014) y los diversos patrones de los segmentos parecen haber evolucionado tempranamente en la historia del género (Cameron *et al.*, 2007). Estas observaciones llevan a diferentes hipótesis sobre el papel adaptativo de la diversificación y convergencia del patrón de color en estos insectos, incluyendo la termorregulación (Heinrich, 2004) y el aposematismo / mimetismo mulleriano (Evans & Waldbauer, 1982; Plowright & Owen, 1980). Sin embargo, la base química de estos patrones no es bien conocida, y hasta ahora solo se ha evidenciado la presencia de melaninas sin mayor distinción.

Hipótesis: La variación de coloración de la pubescencia de las especies de *Bombus* puede ser debido a la presencia de los dos tipos de melaninas, el negro asociado a eumelanina y los colores más claros asociados a feomelanina.

- **Objetivo.** Elaborar un estudio molecular para la caracterización de melaninas por Espectroscopía Raman, para analizar la diversidad y frecuencia del patrón

de color en la pubescencia de hembras de abejorros (Fig. 3.4) de 11 especies (una representada por dos subespecies), pertenecientes a siete subgéneros y, en su caso, si los resultados lo permiten, contrastarlos con la más reciente filogenia del género para evaluar cómo la presencia de los dos tipos de melaninas ha evolucionado a lo largo de la historia del género.

ESTE ESTUDIO SE ENCUENTRA DETALLADO EN EL CAPITULO IV DE LOS RESULTADOS.



Fig. 3.4. Una especie de abejas del género *Bombus* (autor: Carlo Polidori).

Hipótesis 5: La diversidad de las estructuras involucradas en la comunicación, mayormente presentes en las antenas, es todavía poco conocida en los Hymenoptera debido al número limitado de estudios comparativos y el enfoque exclusivo en un único sexo, a pesar de que los datos cuantitativos en ambos sexos pueden ser útiles para comprender mejor el efecto de las potenciales presiones ecológico-comportamentales en la evolución del fenotipo (Zheng *et al.*, 2016; Polidori *et al.*, 2016). La superfamilia Cynipoidea, con más de 3.000 especies descritas en todo el mundo, constituye una de las familias más grandes de Hymenoptera e incluye linajes parasitoides (Ibaliidae, Figitidae) y a la familia Cynipidae, extremadamente diversificada, fitófaga y que representa una radiación increíble de insectos inductores de agallas. Aunque existen datos abundantes sobre la morfología antenal y recientemente publicados para las hembras de los Cynipoidea (Polidori & Nieves-Aldrey, 2014), hay muy pocos datos sobre los machos.

Hipótesis: La variabilidad en el equipamiento sensorial de los Cynipoidea debe estar asociada a la variación de algunos rasgos clave de sus ciclos de vida (parasitoides vs. formadores de agallas, tipo de plantas hospedadoras), y las diferentes presiones selectivas que actúan sobre los dos sexos será observable en esta familia, donde existe un importante dimorfismo sexual en su sistema sensorial.

- **Objetivo.** Realizar un estudio comparativo mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) sobre el equipo sensorial antenal (Fig. 3.5) de 45 especies de Cynipoidea y comparar los resultados con los datos previamente publicados para las hembras.

ESTE ESTUDIO SE ENCUENTRA DETALLADO EN EL CAPITULO V DE LOS RESULTADOS.

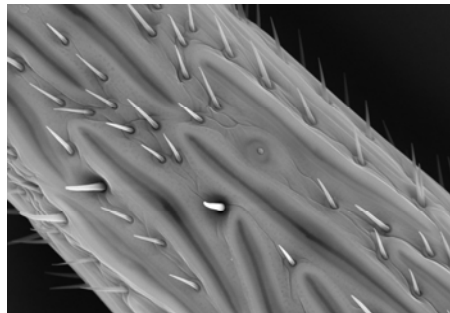


Fig. 3.5. Ejemplo de área de un flagelómero de una antena de Cynipoidea donde se aprecian las sensilas (foto SEM) (autor: Alberto Jorge).

Hipótesis 6: En las abejas (Hymenoptera: Apoidea), como en todos los himenópteros, las antenas son los principales apéndices sensoriales al disponer de una gran variedad de estructuras cuticulares, las sensilas, involucradas en detectar estímulos químicos, mecánicos, térmicos y otros (Wcislo, 1995; Galvani *et al.*, 2012; Fialho *et al.*, 2014). De hecho, se ha constatado que los estímulos olfativos y táctiles detectados por estas sensilas desempeñan un papel central en actividades críticas como la alimentación y el reconocimiento intra e interespecífico (Spaethe *et al.*, 2007; Riveros

& Gronenberg, 2010). Recientemente se ha estudiado la relación entre la morfología y densidad de las sensilas y el tipo de presas en una subfamilia de Crabronidae (Apoidea) (Polidori *et al.*, 2012), el grupo filogenéticamente más cercano a las abejas. Sin embargo, la relación entre aparato sensorial y especialización en el uso del polen no ha sido todavía investigado en las abejas, que incluyen especies desde muy especializadas (oligolécticas) hasta generalistas (polilécticas). Además, estudios cuantitativos y comparativos son muy escasos en abejas (Galvani *et al.*, 2012; Fialho *et al.*, 2014).

Hipótesis: La variabilidad en el equipo sensorial de las abejas está asociada a la variación en su especialización en el uso del polen.

- **Objetivo.** Para comprobar esta hipótesis se estudiarán mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), el tipo, número, densidad y tamaño de los receptores sensoriales periféricos antenales (Fig. 3.6) de las hembras de 20 especies de abejas, abarcando seis de las siete familias existentes, que varían en su especialización trófica.

ESTE ESTUDIO SE ENCUENTRA DETALLADO EN EL CAPITULO VI DE LOS RESULTADOS

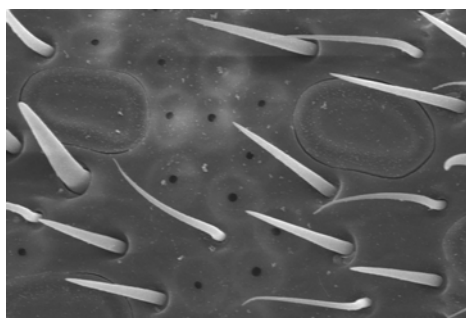


Fig. 3.6. Ejemplo de un área de un flagelómero de una antena de Apoidea donde se aprecian las sensilas (foto SEM) (autor: Alberto Jorge).



Dorotea Barnés González fue una de las pioneras españolas en química durante la llamada Edad de Plata, Nacida en Pamplona en 1904, fue hija del que sería ministro de Educación republicano, Francisco Barnés, estudió en el Instituto Escuela de Madrid y se doctoró en Química en 1931. Asiste a los cursos impartidos en el laboratorio de Química de la Residencia de Señoritas, dirigida por María de Maeztu, y es becada en 1929 para estudiar Química en el Smith College, en EEUU, y en 1930 en Yale. Investigadora del Instituto Nacional de Física y Química, introdujo la espectroscopia Raman en España. Catedrática de Física y Química del instituto Lope de Vega de Madrid, su carrera científica, una de las más brillantes de una mujer en la primera parte del siglo, quedó truncada por su matrimonio («A mí me retiró de la ciencia mi marido», declaró a los noventa años), y por la guerra civil, que le llevó al exilio. Regresó a España en 1940, donde fue inhabilitada para la enseñanza y no volvió a investigar.

Este capítulo es mi dedicatoria a todas aquellas mujeres que han realizado aportaciones a la ciencia y que llevan mucho tiempo invisibilizadas.

IV

Material y Métodos

La metodología empleada para la realización de esta tesis doctoral, que es un compendio de publicaciones, se ha dividido en una serie de categorías: trabajo basado en las colecciones científicas, trabajo de laboratorio y trabajo de gabinete. Aunque todos los capítulos de resultados experimentales cuentan con sus propios apartados de Material y Métodos, en este capítulo nos extenderemos con más detalle sobre los procedimientos y especificaciones generales de cada técnica, con el fin de que el lector pueda profundizar en la metodología conducente a la obtención de los resultados

4.1. Trabajo museístico y otras fuentes del material estudiado

Tradicionalmente las Colecciones de Historia Natural (CHN) han sido custodiadas en museos, universidades o instituciones científicas dedicadas a la Historia Natural o a las Ciencias Naturales. Es durante el siglo XVIII cuando se crean los principales museos modernos y se consolidan las primeras colecciones científicas transformándose, no solo como centros de custodia y exhibición de piezas con un valor científico e histórico, sino como lugares de investigación, convirtiéndose en puntos de referencia para los investigadores de Biología e Historiadores de las Ciencias. Este papel crucial se debe al hecho de que las CHN, representan repositorios de diversidad biológica donde se almacenan la información genética y filogenética, inherente a los propios organismos, la información biogeográfica (Boakes *et al.*, 2010), los cambios fenológicos (por ejemplo, tiempo de floración) (Robbirt *et al.*, 2011), los cambios evolutivos (genéticos o morfológicos), cambios bioquímicos e

isotópicos en respuesta al cambio climático (Inger & Bearhop, 2008), la información ecológica y biográfica, las series temporales históricas (colecciones paleontológicas) y modernas (es decir, la misma localidad y / o taxón ha sido recolectado regularmente durante muchos años) e incluso georreferenciación (estableciendo los datos de latitud y longitud) (Lister, 2011).

En un momento en que la conservación de la biosfera es una prioridad, ahora que las tasas de extinción superan las tasas de fondo natural (Pimm & Brooks, 1995), las CHN (junto con nuevas técnicas analíticas para explotar material preservado) representan un recurso fundamental en los estudios de biodiversidad, evolución, ecología, biogeografía y taxonomía, proporcionando un punto de referencia para contabilizar las pérdidas actuales y futuras de especies, en concreto, permiten cuantificar las continuas reducciones en las estimaciones de los insectos del mundo (Stork *et al.*, 2015).

Como epílogo general del activo de incalculable valor que representan las Colecciones de Historia Natural, más allá de la relevante investigación básica de botánicos y zoólogos, directa o transversalmente, a través de disciplinas como la Biomedicina, las Ciencias de la Tierra y del Espacio, las tecnologías o la Economía, se destaca el acto de clausura del 20º XX aniversario del CETAF (2016), desde donde se subrayó que las colecciones naturales son el futuro para buscar soluciones o aportaciones en campos como la Bioeconomía, la Bioinformática, la Sanidad, la Seguridad Alimentaria o el Cambio Global.

Para la realización de esta tesis doctoral se han utilizado tanto las Colecciones de Entomología del Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN), como la Colección de Entomología de la Universidad Complutense de Madrid (UCME). Asimismo, algunos ejemplares han sido enviados para su estudio por conservadores, investigadores o responsables de colecciones privadas.

La Colección de Entomología del MNCN se sitúa, por su valor científico, representación geográfica y número de insectos conservados, entre las diez primeras de Europa y como la mejor a nivel nacional; teniendo en cuenta solo el número de ejemplares, se han contabilizado unos dos millones de insectos más un volumen aproximado a este que corresponde a material pendiente de incorporación.

El conjunto de lo inventariado en la colección de Hymenoptera alcanza un total de 1.154 géneros. El criterio seguido para la agrupación de subórdenes, superfamilias y familias es básicamente el de Gauld & Bolton (1988). Para el estudio de los grupos de Hymenoptera Parasítica de las superfamilias Cynipoidea y Chalcidoidea, que forman parte esencial de este estudio, nos hemos basado fundamentalmente en los materiales que forman parte de esta colección. Asimismo, pertenecen a esta colección de Hymenoptera del MNCN algunos de los Apoidea utilizados en el estudio.

La colección de Entomología de la Universidad Complutense (UCME), la segunda en importancia a nivel nacional, está formada por más de cuatro millones de ejemplares, registrados en la base de datos mundial de colecciones entomológicas "*The Insect and Spider Collections of the World*" con sede en el Bishop Museum de Hawaii. La mayoría de las especies utilizadas en los trabajos sobre Apoidea se encuentran en esta valiosísima colección.

4.2. Trabajo de laboratorio

El trabajo de laboratorio se ha dividido en dos tareas distintas: Preparación de las muestras y utilización de técnicas instrumentales no destructivas aplicadas al estudio de himenópteros.

4.2.1. Preparación de muestras

La preparación de las muestras ha sido diferente de acuerdo a las distintas técnicas empleadas para su estudio.

Microscopía Estereoscópica

Para la preparación de los ejemplares para observación de caracteres diagnósticos y obtención de fotografías del *habitus* del ejemplar adulto con microscopía óptica, se utilizaron las técnicas habituales de montaje en seco de los insectos himenópteros adultos en los que se ha centrado nuestro estudio. (Véase Schauff (2001) para una síntesis de las técnicas habituales y Noyes (1982) para especificaciones sobre microhimenópteros).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La preparación de las muestras para SEM estuvo condicionada por la naturaleza de la muestra. En los trabajos de esta tesis doctoral hemos contado con material proveniente de colecciones para observación directa sin preparación ni disección previa, además de material diseccionado y metalizado con bombardeo iónico de oro (Au). En el primer caso el proceso de observación es más delicado, ya que hay que tener especial cuidado en la manipulación e introducción de los ejemplares en el SEM para preservar su integridad. Así, los ejemplares seleccionados se introdujeron directamente en la cámara del SEM, en modo bajo vacío, soportados mediante una plastilina sin residuo y girando los ejemplares manualmente para poder visualizar las partes dorsales, ventrales y laterales. Este método sirvió para fotografiar, tanto microhimenópteros conservados mediante las técnicas usuales de preparación y conservación (Noyes, 1982) que conlleva el secado “al aire” y el pegado de costado por medio de una goma soluble en agua sobre rectángulos de cartulina de tamaño apropiado, como para aquellos grandes ejemplares cuya técnica de preparación y

conservación para el montaje en seco es mediante el empleo de microalfileres de Entomología.

Para el resto de ejemplares se utilizó la deshidratación en alcohol etílico en concentración creciente, disección de sus partes de interés, separando cabeza, mesosoma, metasoma, sistema genital masculino, antenas, mandíbulas, alas y patas.

Las diferentes partes del cuerpo, excepto las alas se montan pegadas con un adhesivo conductor de grafito a un portamuestras de aluminio, se secan al aire y se metalizan con un recubrimiento de oro antes de pasar a su observación en el microscopio electrónico, en modo alto vacío. La técnica se detalla en Ronquist y Nordlander (1989) y Quicke (1997).

Cátodoluminiscencia (CL)

Esta técnica únicamente nos permite trabajar con los ejemplares hidratados sin metalizar por lo que su preparación fue la misma, ya explicada para la obtención de imágenes en SEM de los ejemplares de CHN.

Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)

La misma preparación para la obtención de imágenes sirve para microanálisis de EDS ya que ambas técnicas nos proporcionan la posibilidad de trabajar tanto con las muestras hidratadas como aquellas deshidratadas y metalizadas. Únicamente se debe tener la precaución de indicarle al software el modo de trabajo para que las cuantificaciones sean correctas.

Espectroscopía Raman

Al igual que en las preparaciones de SEM, todos los individuos fueron analizados preservando su técnica de conservación, bien en alfiler entomológico bien en conservante líquido (generalmente alcohol a diversas diluciones), en este último caso

los ejemplares previamente fueron secados sobre papel absorbente a temperatura ambiente.

En relación a los análisis de pterinas se empleó pterina sintética en polvo al 95% de Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE. UU. (P1132), depositado sobre un disco de bromuro potásico (KBr) para conseguir que la señal capturada a la salida tenga una relación señal-ruido adecuada al realizar la transmisión de la radiación próxima al infrarrojo de la muestra. El KBr en la región espectral de estudio es transparente y representa la matriz de soporte que no interviene en la absorción de radiación incidente proveniente del láser.

Para la extracción de pteridinas, todos los procedimientos fueron realizados en una habitación oscura, implicó agregar 10-50 μ l de metanol acidificado, NaCO_3 0,01 M, agua caliente, centrifugación a 13.2 rpm durante 1 minuto, calentamiento de la muestra a 80 ° C durante 1 minuto y enfriamiento rápido de la muestra en hielo (Hines *et al.*, 2008).

4.2.2. Técnicas analíticas no destructivas

El propósito de este capítulo es dar una sucinta descripción sobre las técnicas instrumentales que se han empleado comúnmente en estudios de taxonomía y análisis morfológico tradicional como puede ser la microscopía electrónica, pero también detenernos en explicar aquellas técnicas analíticas de investigación no muy utilizadas en esta disciplina e implementadas en esta tesis como las técnicas espectroscópicas (Energía Dispersiva de Rayos X y Espectroscopia Raman) y técnicas de luminiscencia (Cátodoluminiscencia).

Las técnicas de microscopía han facilitado el estudio de los caracteres externos de cada taxón, mientras que las técnicas espectroscópicas y de luminiscencia nos han

ayudado a dilucidar diferencias en composición tanto a nivel elemental como molecular, así como el estudio de características estructurales a microescala.

4.2.2.1. Microscopía estereoscópica

Las fotografías del *habitus* del insecto adulto de los especímenes de esta tesis fueron tomadas mediante una cámara digital Leica DFC290 montada en microscopio estereoscópico Leica M165 C con óptica totalmente apocromática corregida de zoom 16.5: 1 que permite la adquisición de imágenes de alta calidad con resolución de hasta 906 lp/mm con el objetivo apocromático plano 2.0x. Los planos focales fueron integrados con el software Helicon Focus 4.62.2. Todas las medidas se expresaron en centímetros.

4.2.2.2. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Desde principios de la década de 1970 (Herman, 1972), la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) ha tenido un papel cada vez más importante en varios campos de estudio taxonómicos en artrópodos, especialmente, en la exploración de la escultura superficial fina y otros aspectos morfológicos mal resueltos o imposibles de evaluar con un microscopio estereoscópico estándar (Rota, 2005; Whitmore 2009, 2011; Akkari & Enghoff, 2011, 2012; Grzywacz *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2012; Shear, 2012). Los taxónomos se enfrentan con el reto de proporcionar caracteres diagnósticos claros y concisos en sus descripciones de las especies, a menudo con estructuras de morfología compleja. El nivel de detalle y magnificación proporcionada en la actualidad por SEM, se aprovecha comúnmente para facilitar la descripción e interpretación, de los diferentes estados del carácter morfológico filogenético (Edgecombe & Hollington

2005; Chani-Posse, 2013; Nieves-Aldrey, 2001; Liljeblad *et al.*, 2008; Polidori *et al.*, 2013).

Un microscopio electrónico de barrido consta de un emisor o cañón de electrones donde se genera el haz de electrones, un sistema de lentes condensadoras y de objetivo en la columna, encargado de focalizar el haz de electrones, un sistema de barrido que lo hace recorrer la superficie de la muestra mediante unas bobinas deflectoras de barrido, uno o varios sistemas de detección que permiten captar el resultado de la interacción del haz de electrones con la muestra en forma de señal eléctrica y diversos sistemas que permiten observar el resultado de la interacción del haz con cada punto de la superficie en el proceso de barrido. Además, para que el conjunto funcione adecuadamente, es preciso que se cumplan unos requisitos de vacío, y por tanto que haya unos sistemas encargados de producirlos.

En esta tesis hemos utilizado un cañón de efecto termoiónico con emisor de electrones de wolframio, formado por un alambre de este material de 0,1 mm de diámetro doblado en forma de horquilla. Este alambre se calienta directamente mediante el paso de corriente pudiendo alcanzar unos 2700°K como temperatura de trabajo lo que se traduce una densidad de corriente de filamento de 1,75 A/cm², con estas condiciones y considerando un potencial de aceleración entre 20-25 kV conseguimos una gran calidad de imagen con resoluciones entre 50 y 20 Å con un mantenimiento mínimo y una estabilidad muy alta. La columna está formada por las lentes electromagnéticas que conducen la trayectoria del haz de electrones para permitir la obtención de imágenes y limitan el espacio físico recorrido por el haz. Está limitada en su parte superior por la cámara del filamento y en su parte inferior por la cámara del portamuestras comúnmente aisladas mediante válvulas para poder cerrarlas individualmente y poder realizar operaciones como el cambio de filamento o el cambio de muestra, sin romper el vacío en el resto de la columna. Es en la columna donde podremos cambiar la corriente de las lentes y del filamento, el voltaje de

62

polarización (bias) y la corriente del sistema corrector de astigmatismo, ya que el comportamiento astigmático de las lentes cambia con el tiempo y con la naturaleza de las muestras observadas. La corriente de las bobinas deflectoras del sistema de barrido, para conseguir los movimientos de oscilación y barrido del haz de electrones, se suele ajustar automáticamente, de acuerdo con las condiciones prefijadas, sin embargo, es común que el operador pueda emplear distintas velocidades de barrido según las diferentes aplicaciones.

Las lentes electromagnéticas en Microscopía Electrónica no son parte del sistema de formación de la imagen, sino que se usan para reducir y enfocar el diámetro del haz de electrones sobre la superficie de la muestra. El sistema de lentes está compuesto por un conjunto de lentes condensadoras, y por la lente de objetivo.

Las dos grandes ventajas de un microscopio electrónico de barrido son el rango de ampliación y la profundidad de campo de la imagen. La profundidad de campo es la propiedad por la cual las imágenes se forman a partir de enfocar, a la vez, superficies que se encuentran a diferentes alturas. La profundidad de campo depende de la divergencia del haz de electrones, el cual viene definido por el diámetro de la apertura de la lente de objetivo y la distancia entre la muestra y dicha apertura.

El vacío es un requisito necesario en un SEM para evitar la dispersión de electrones como consecuencia de choques con las distintas moléculas que pueden encontrarse en el interior de la columna y preservar la contaminación por la absorción de moléculas de gas por las superficies interiores de la columna. La extracción del aire en el SEM utilizado en los diferentes trabajos de esta tesis se ha realizado mediante dos bombas de vacío rotatorias. Para los trabajos con material procedente de CHN se necesitaron condiciones de bajo vacío que operan con presiones entre 0 y 5 torr. Esto se consigue gracias a la ionización del gas presente en el interior de la cámara, que en este caso es vapor de agua, que amplifica la señal de los electrones secundarios, además en estas muestras no conductoras existe una concentración de carga

negativa en la superficie, debido a la repulsión de los electrones incidentes (llamados efectos de carga), que provocan una mala resolución de imagen pero que es contrarrestada por los iones positivos resultantes de la ionización del gas que son atraídos por la superficie de la muestra permitiendo así una buena resolución de imagen.

Al interactuar un haz de electrones sobre un material sólido se pueden producir diversos procesos de disipación de energía (Boggs & Krinley, 2006) que caracterizan el material: liberación de fotones (rango UV, visible, infrarrojo y cátodoluminiscencia); rayos X; electrones secundarios; electrones retrodispersados; fonones (calor) y electrones Auger (Fig. 4.1a).

Los fenómenos de cátodoluminiscencia y rayos X se exponen más abajo como apartado propio. En cuanto a las interacciones del haz con la muestra para la obtención de imágenes, se han utilizado dos detectores: el de electrones secundarios (Large Field Detector, LFD), con energías hasta 50 eV, emitidos como consecuencia de procesos inelásticos de ionización con el haz incidente y el de electrones retrodispersados (Back Scattering Electron Detector, BSED), producidos como consecuencia de choques elásticos o “cuasi-elásticos”. Por convenio se consideran BSED aquellos electrones con energía entre 50 eV y la energía del haz incidente. La intensidad de los electrones retrodispersados depende del número atómico promedio de la muestra pues elementos más pesados producirán más electrones retrodispersados. Los electrones secundarios contienen fundamentalmente información topográfica, y los retrodispersados contienen información acerca del número atómico de las diferentes fases que componen una muestra, la topografía, la cristalinidad, etc. Hoy en día se puede hacer uso combinado de ambos tipos de electrones gracias a los grandes avances que se han producido en los detectores de retrodispersados que permiten obtener buenas imágenes con gran número de cuentas.

4.2.2.3. Cátodoluminiscencia fría (CL)

Al interaccionar un electrón acelerado de alta energía con un material, se excitan múltiples señales a través de todos los mecanismos luminiscentes presentes en el material con las que poder caracterizar sus propiedades químicas, electrónicas y estructurales. La luminiscencia varía desde rangos de longitud de onda ultravioleta a infrarrojo. Los procesos luminiscentes son el resultado de múltiples interacciones dentro de la red cristalina pero la información espectral que puede suministrar la excitación por irradiación de una estructura cristalina no está limitada a la emisión de luz. Por tanto, se debería hablar sobre algunas generalidades de los principios físicos fundamentales de la luminiscencia para comprender mejor los diferentes mecanismos luminiscentes y su influencia en la información espectral.

El fenómeno físico de la luminiscencia puede ser descrito en términos de tres procesos elementales: excitación (absorción), emisión, y transiciones no radiativas. Cuando se excita un material con varios tipos de energía, los electrones pueden promocionar a otros niveles de energía mayores dejando una vacante en su nivel original, lo que se visualiza por la aparición de una banda de absorción en el espectro óptico (excitación/absorción). Transcurrido un pequeño lapso de tiempo el electrón puede perder energía y regresar a su "estado basal". El sistema luminiscente puede también volver del estado excitado al fundamental mediante transiciones emisivas, o a través de transiciones no radiativas. En estas últimas, la energía se absorbe en forma de fonones, implicados en el calor, muy difícil de medir porque, en la práctica, es del orden de magnitud del ruido de cualquier medida. En el caso de transiciones emisivas, la longitud de onda de la luz emitida (energía del fotón) depende de la diferencia de energía entre el estado excitado y el estado fundamental. Sin embargo, en la mayor parte de los materiales sólidos tanto inorgánicos como orgánicos la presencia de

defectos en sus estructuras provoca que las transiciones electrónicas ocurran entre la banda de valencia y la de conducción (Fig. 4.1b-c), pudiendo constituir “trampas” para los electrones que los interceptarían atrapándolos momentáneamente. Los electrones atrapados en estos “defectos” se denominan *centros de luminiscencia*.

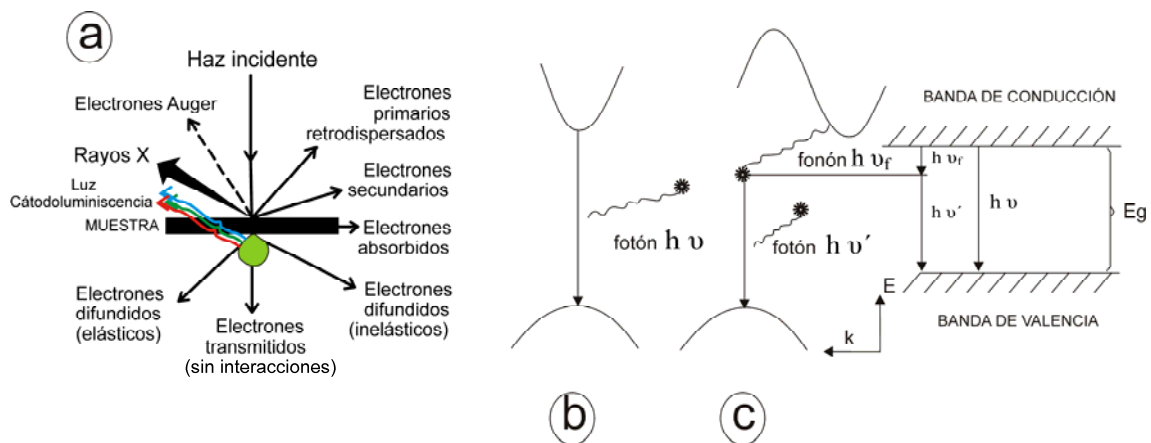


Fig. 4.1: Conjunto de los distintos procesos de disipación de energía producidos por el choque de un haz incidente que caracterizan un material (a). Dependiendo de la estructura de bandas del material se pueden distinguir dos tipos de transiciones interbanda, una directa y otra indirecta. En la primera se produce una colisión sin variación del momento, entre el electrón y el hueco con la consiguiente emisión del fotón (b). En los procesos indirectos se produce una colisión de tres cuerpos electrón-hueco-fonón, en donde la emisión del fonón resulta imprescindible para la conservación del momento, ya que en estos casos, el momento del fotón es despreciable comparado con el del electrón y la transición se tiene que realizar entre estados con igual momento (c). Modificada de Aballe *et al.* (1996).

Se reconocen dos tipos de centros de luminiscencia: *centros extrínsecos*, relacionados con átomos/iones de impurezas (activadores) y cuya energía (longitud de onda), correspondiente a la luminiscencia emitida, puede relacionarse con el tipo de defecto impureza o una combinación de ambos y *centros intrínsecos*, los cuales resultan de transiciones banda-banda. Los centros electrón-hueco sin cambios en la química general del cristal (incluyendo vacantes) pueden considerarse como defectos “intrínsecos” y la luminiscencia relacionada también se llama “intrínseca”.

Dentro de los extrínsecos los más comunes son los centros de activación. Los *activadores* son iones que pueden sustituir cationes en la estructura, por ejemplo, el

manganeso (Mn^{2+}) que puede sustituir al calcio (Ca^{2+}) y al magnesio (Mg^{2+}) en los carbonatos. Algunos iones no son activadores en sí mismos, pero tienen la propiedad de absorber la energía para posteriormente transmitirla a iones activadores, a estos iones se les denomina sensibilizadores como son el plomo (Pb^{2+}) que puede transmitir, por ejemplo, energía al manganeso (Mn^{2+}) y al cerio (Ce^{3+}). Por otra parte, aquellos iones que suprimen la emisión de cátodoluminiscencia por parte de los iones activadores, porque atrapan parte de los iones activadores, se les denomina inhibidores, porque atrapan parte de la energía absorbida por estos, como por ejemplo son el hierro (Fe^{3+} , Fe^{2+}), cobalto (Co^{2+}) y níquel (Ni^{2+}).

Los centros intrínsecos de luminiscencia pueden ser originados por una gran variedad de defectos en la estructura. Marshal (1988) sugiere que la luminiscencia intrínseca puede ser aumentada por los siguientes factores: que la composición del sólido sea no estequiométrica; las imperfecciones estructurales y las impurezas no activadoras que pueden ser sustituciones intersticiales que distorsionen la celda cristalográfica (como dislocaciones y/o defectos planares).

La cátodoluminiscencia es pues un fenómeno no destructivo que se debe a la emisión de luz (fotones) como el resultado de un bombardeo de un haz de electrones de alta energía (el cátodo es una fuente de electrones) que eleva la muestra a un estado excitado para después inducir la a emitir un fotón cuando la muestra regresa al estado fundamental.

Para que esto se produzca es necesario alcanzar condiciones de vacío y una fuente de electrones. El acoplamiento de la CL con la Microscopía Electrónica de Barrido nos proporciona unas condiciones de vacío adecuadas, así como un haz de electrones con potenciales aceleradores del orden de 1kV hasta 30 kV y 1-5 mA de corriente lo que nos permite complementar los datos texturales obtenidos tanto en modo pancromático (las imágenes se obtienen a partir de varias longitudes de onda) como seleccionando una única longitud de onda determinada (modo monocromático).

El microscopio electrónico tiene claras ventajas sobre la microscopía de luz convencional, ya que la resolución espacial de la microscopía de luz está limitada por la física fundamental a una resolución aproximada de 200-300 nm (o la mitad de la longitud de onda de la fuente de iluminación). Sin embargo, en un microscopio electrónico, puedes enfocar el haz de electrones a un punto muy pequeño que potencialmente es capaz de resolver características de hasta 1 nm. Por lo tanto, el volumen de información de un espécimen combinado con la capacidad de correlacionarlo directamente con la información de la luminiscencia (espectroscopía) es lo que hace que la cátodoluminiscencia sea una técnica de caracterización tan poderosa, única para caracterizar la composición y las propiedades ópticas y electrónicas de algunos materiales que no pueden detectarse por otros métodos analíticos, para luego correlacionarlos con la morfología, microestructura, composición y química a micro y nanoescala.

En muchos casos, la intensidad de la cátodoluminiscencia se puede relacionar directamente con la concentración de una impureza de elementos traza y, en algunos sistemas materiales, se puede realizar un análisis cuantitativo. Aunque la cátodoluminiscencia no es una técnica analítica de huellas dactilares, como la espectroscopia de emisión atómica o la espectroscopía de rayos X (EDS), la longitud de onda de emisión medida corresponde a la transición electrónica implicada. Mediante el uso de la literatura y los espectros de referencia, es posible asignar qué impureza es responsable de la emisión.

La técnica de CL puede detectar la señal óptica de luminiscencia a través de imagen o mediante análisis espectrales.

Obtención de imágenes y espectros de CL

Las imágenes y espectros de CL se obtienen a partir de la señal de luminiscencia que se genera cuando el haz de electrones del SEM incide sobre la muestra.

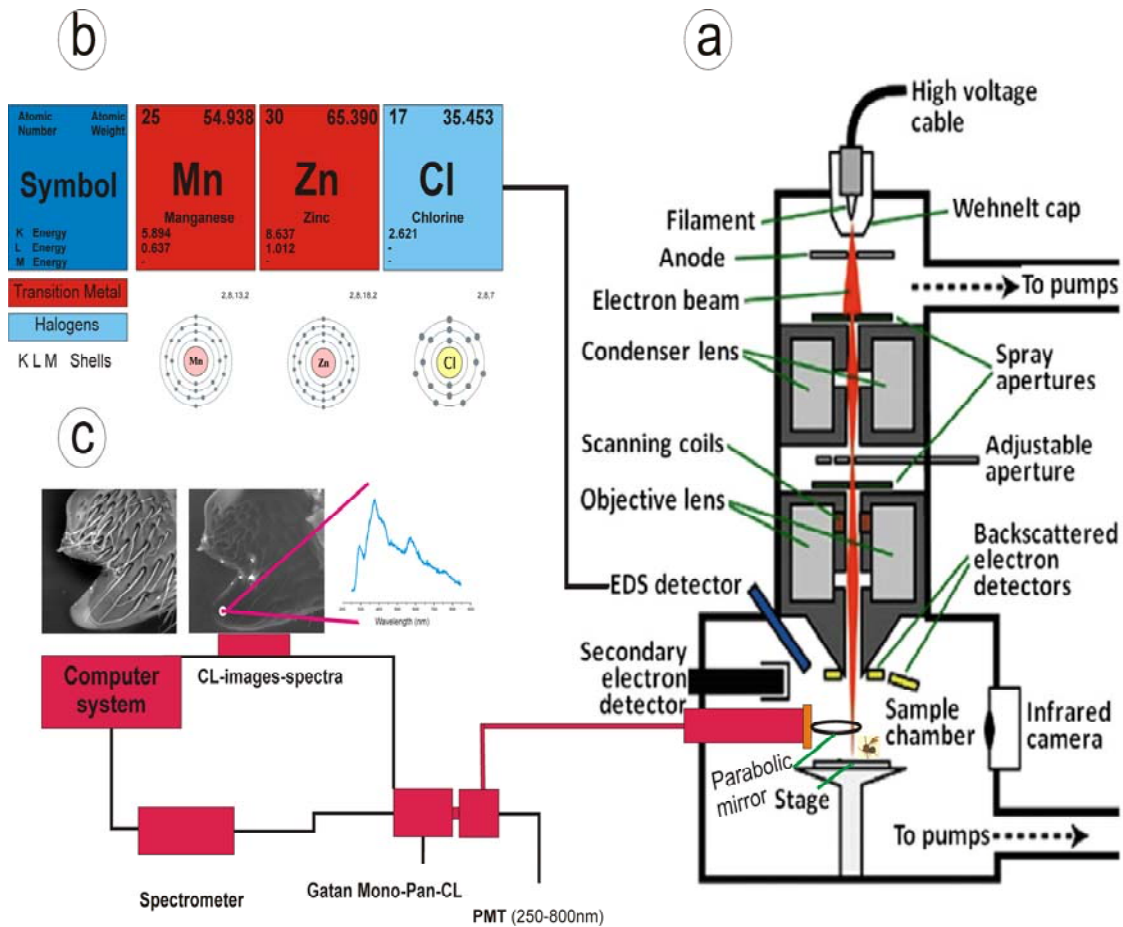


Fig. 4.1. Esquema de un microscopio electrónico de Barrido acoplado a un detector de Energía dispersiva de Rayos X y un detector de Cátodoluminiscencia donde se muestran los componentes principales (a). Obsérvese que con el detector EDS se puede obtener información analítica a nivel elemental mediante la radiación X característica de cada átomo que se obtiene cuando se le hace incidir a la muestra un haz de electrones (b). Nótese el camino (color granate) que han de recorrer los fotones generados mediante el haz de electrones que son recogidos en el detector de Cátodoluminiscencia para la obtención tanto de imágenes pancromáticas o monocromáticas como de espectros (c).

Las imágenes de CL pancromáticas miden la variación en las intensidades de la luz emitida a medida que el haz de electrones se escanea en un patrón XY a través de una muestra. La imagen pancromática o policromática es el método más simple para cuantificar la luz total emitida en cada píxel, se obtiene adaptando el detector a una de las ventanas del microscopio donde los fotones emitidos por la muestra se focalizan gracias a una lente de fluoruro de calcio (CaF_2) introducida dentro de la cámara del SEM a través de una guía. Posteriormente, esta señal amplificada y filtrada de ruidos se lleva hasta un digitalizador de imágenes donde se sincroniza con el sistema de barrido del microscopio obteniéndose, de esta manera, la imagen de CL. Las imágenes monocromáticas se obtienen de la misma forma, pero intercalando un monocromador entre la ventana del microscopio y el detector. Seleccionando la longitud de onda deseada en el monocromador, al detector sólo le llegará la radiación correspondiente a la misma. Por tanto, la imagen así formada solo estará constituida por una única longitud de onda lo que permitirá analizar la distribución espacial de los centros radiativos que provocan esta emisión (Fig. 4.1)

El sistema Mono CL3 de Gatan UK utilizado, ofrece máxima sensibilidad y resolución espacial en un amplio rango de longitudes de onda desde el UV profundo hasta el infrarrojo cercano (200 y 900 nm (1.38-4.95 eV)). Se han utilizado ópticas de recolección acromáticas con eficiencia de recolección optimizada y con pérdidas ópticas mínimas mediante acoplamiento óptico directo, lo que ha facilitado la obtención de imágenes pancromáticas y monocromáticas de mayor eficacia y análisis por espectroscopía incluso en muestras con emisiones de intensidades fotónicas muy bajas, cuyos espectros de CL son raros de ver en las publicaciones actuales, debido a que no todos los equipos de CL alcanzan estos niveles de sensibilidad y resolución y por lo tanto pueden obtener espectros de este tipo de muestras (por ejemplo orgánicas e hidratadas como la cutícula). Como método para la recolección de luz utiliza un

fotomultiplicador (PMT) como detector sensible a la luz. El sistema detecta la luz que llega al detector y luego registra su intensidad.

La adquisición de los espectros de CL se realiza introduciendo, entre la ventana del microscopio y el detector, un monocromador, en nuestro caso un Czerny-Turner 300mm controlado por ordenador a través de una conexión RS 232. El monocromador está provisto de una red de difracción intercambiable dependiendo del rango espectral que se quiera analizar. En este trabajo, se han empleado una única red de difracción capaz de cubrir el rango 200-1800 nm (1800 líneas/mm).

4.2.2.4. Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)

Los rayos X se generan como consecuencia de choques inelásticos de los electrones incidentes que excitan los átomos de la muestra cediéndoles parte de su energía cinética. El microanálisis EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) es una técnica de análisis no destructiva donde la radiación utilizada son los rayos X característicos que emite la muestra cuando los átomos vuelven a su nivel fundamental después de haber sido bombardeados con electrones. El análisis de esta radiación proporciona una información analítica sobre la composición del total o de zonas de la muestra de hasta unas cuantas micras de diámetro permitiendo detectar la presencia de un elemento cuya concentración sea de algunos cientos de partes por millón (ppm). El analizador de Energía Dispersiva dispone de una geometría particularmente buena y un sistema software moderno que permite el análisis tanto en condiciones de bajo como de alto vacío.

La radiación X que emerge de la muestra al incidir sobre ella el haz de electrones del SEM, se recoge en un detector de Si (Li), que opera conectado con un analizador multicanal que discrimina los fotones de rayos X en función de su energía y

un ordenador. En el análisis de los resultados deben tenerse en cuenta el número atómico Z de los elementos estudiados (retrodispersión y frenado), así como la Absorción de rayos-X y los fenómenos de fluorescencia. Dichas correcciones, conocidas como ZAF, evalúan de forma independiente estos tres fenómenos físicos, que se desarrollan durante la generación y emisión de los rayos X en la muestra y en el patrón habiéndose demostrado que son aplicables a cualquier tipo de muestra y realizándose de modo automático en el sistema de microanálisis utilizado en esta tesis, (INCA Oxford Instruments), permitiendo el cálculo de los distintos factores de corrección.

La identificación de los picos se inicia por el más intenso, del que se determina su energía y, por consiguiente, la línea y el elemento al que probablemente pertenece, a continuación, se deben localizar las restantes líneas de dicho elemento existentes en el espectro, para confirmar su presencia en la muestra. En el proceso de identificación de un elemento, es de gran ayuda conocer las intensidades relativas de los distintos grupos de líneas, puesto que, si la relación entre dos picos de un mismo grupo se desvía del valor que típicamente le corresponde, hay que suponer que se ha cometido un error en la identificación del elemento, en general, puede establecerse que la intensidad relativa de las dos líneas K es $K\alpha$ (1) y $K\beta$ (0.1), lo que significa que la relación $K\alpha/K\beta$ es aproximadamente 10:1. A su vez, la intensidad relativa del grupo de líneas L es: $L\alpha$ (1), $L\beta_1$ (0.7), $L\beta_2$ (0.2), $L\beta_3$ (0.08), $L\beta_4$ (0.05), $L\gamma_1$ (0.08), $L\gamma_3$ (0.03), $L\eta$ (0.04), $L\eta$ (0.01). Finalmente, las líneas M observables tienen la siguiente intensidad relativa: $M\alpha$ (1), $M\beta$ (0.6), $M\gamma$ (0.05) y $M\xi$ (0.06) (J. López Ruiz, 1996).

Una vez identificadas todas las líneas importantes de la región de elevada energía del espectro, se pasa a la región de baja energía del mismo y se repite el proceso de identificación. A este respecto se deberá tener en cuenta que, en esta región, y sobre todo por debajo de 3 keV, la separación de los miembros de las

familias K, L o M es prácticamente imposible, por lo que el número de líneas a examinar será mucho más reducido que en la región de >5 keV.

Por último, los análisis tienen que considerar los elementos que puedan haber quedado enmascarados por las interferencias, especialmente problemático para los elementos minoritarios.

4.2.2.5. Espectroscopia Raman

La Espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. La regla de selección general para transiciones rotacionales y vibracionales Raman es que la molécula debe ser anisotrópicamente polarizable, es decir, que la distribución electrónica de la molécula pueda ser distorsionada dependiendo de la dirección del campo eléctrico con respecto a la molécula. Todas las moléculas lineales y diatómicas (homonucleares o heteronucleares) tienen polarizabilidades anisotrópicas, por lo que son rotacionalmente Raman-activas, sin embargo, las colisiones moleculares no tienen por qué obedecer a estas restrictivas reglas de selección, por lo que estas pueden provocar cualquier estado rotacional.

La espectroscopia Raman puede ser utilizada para caracterizar muestras altamente hidratadas como consecuencia de su poca sensibilidad a las moléculas de agua y viene aplicándose al estudio de las moléculas biológicas con notable éxito desde hace algunos años. Las muestras a analizar en Raman no requieren preparación previa lo que acelera y simplifica notablemente su análisis en el laboratorio. Además, la superficie analizada no sufre alteración alguna y se necesita una cantidad muy pequeña. Los análisis son no invasivos por lo que se está aplicando esta tecnología para análisis provenientes de CHN y también con tejidos vivos.

El equipo Raman utilizado en esta Tesis Doctoral para el estudio de la influencia del melanismo en aspectos ecomorfológicos dentro del orden Hymenoptera, presenta un acoplamiento con un microscopio confocal que ha permitido realizar análisis “in situ” con elevada resolución espacial lateral XY (de hasta el orden de un micrómetro) mejorando la claridad, nitidez, contrastes y resoluciones de la imagen (necesario para localizar las áreas de trabajo), además presenta una fuente de láser diodo de 780nm de longitud de onda correspondiente al espectro electromagnético del infrarrojo cercano NIR donde se excitan las melaninas.

El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromática intensa (generalmente un láser) con energía $h\nu_0$ (donde h es la constante de Plank y ν_0 la frecuencia incidente) sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de los fotones atraviesan la muestra, pero una pequeña fracción son dispersados (del orden de 1 fotón dispersado por cada 10^{11} incidentes) (Fig. 4.2). Pueden distinguirse los siguientes casos:

- 1) Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, se dice que el choque es elástico; la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón dispersado tiene la misma frecuencia ν_0 que el incidente, dando lugar a la dispersión Rayleigh, que no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada
- 2) Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a una frecuencia distinta del incidente, se dice que el choque es inelástico y es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra conocida popularmente como dispersión Raman o efecto Raman; en este caso se pueden dar dos fenómenos:

- a. Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que pasa a un estado de mayor energía al que tenía inicialmente; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 - \nu_r$ y se produce la dispersión *Raman Stokes* (Fig 4.2)
- b. Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; esto significa que la molécula, inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado; el fotón es dispersado con frecuencia $\nu_0 + \nu_r$ y se produce la dispersión *Raman anti-Stokes*.

Cada material tendrá un conjunto de valores ν_r que van a ser característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman. Las moléculas diatómicas tienen sólo un modo de vibración, el estiramiento del enlace. En moléculas poliatómicas hay varios modos de vibración, pues todas las longitudes y ángulos de enlace pueden modificarse y los espectros vibracionales son muy complejos. Sin embargo, la espectroscopía Raman se puede utilizar para obtener información acerca de la estructura de sistemas tan grandes y complejos como los tejidos animales y vegetales.

El desplazamiento de las frecuencias Raman respecto a la frecuencia incidente ν_0 es independiente de esta última y por ello suele tomarse como abscisa para representar los espectros Raman, situando el centro de la banda Rayleigh como origen del eje. Así, en el eje de abscisas en realidad aparecerá la diferencia entre la frecuencia Raman y la de excitación del láser, normalizada respecto a la velocidad de la luz.

$$\tilde{\nu} = (\nu - \nu_0) / c = 1 / \lambda \text{ [cm}^{-1}\text{]}$$

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzman, el 99% de las moléculas se encuentra en el estado vibracional de menor energía y, por tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es del orden de 100 veces superior a la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esta diferencia entre la intensidad del efecto Stokes y el anti-Stokes ha supuesto que en este trabajo únicamente se hayan medido y representado gráficamente el efecto Stokes hace que habitualmente se trabaje midiendo sólo el efecto Stokes.

Las características del sistema experimental mencionado son: a la entrada del espectrómetro se encuentra el sistema dispersivo, que consta de un monocromador o un filtro cuyo fin es eliminar la señal Rayleigh, seguidamente se coloca un monocromador para dispersar la señal Raman procedente de la muestra en sus distintos componentes.

Existen distintas configuraciones: sistemas de doble monocromador, de triple monocromador o el más utilizado en los últimos años, sistemas de un filtro holográfico y monocromador. El fin de todos estos sistemas es que llegue al detector una señal Raman adecuada. El detector más común en estos equipos es el detector de acoplamiento de carga (CCD, Charge Coupled Device) que ofrece una sensibilidad muy elevada. Éste transforma los fotones de la luz dispersada por la muestra en señal eléctrica digital y el espectro es reemitido al ordenador donde se visualiza y procesa.

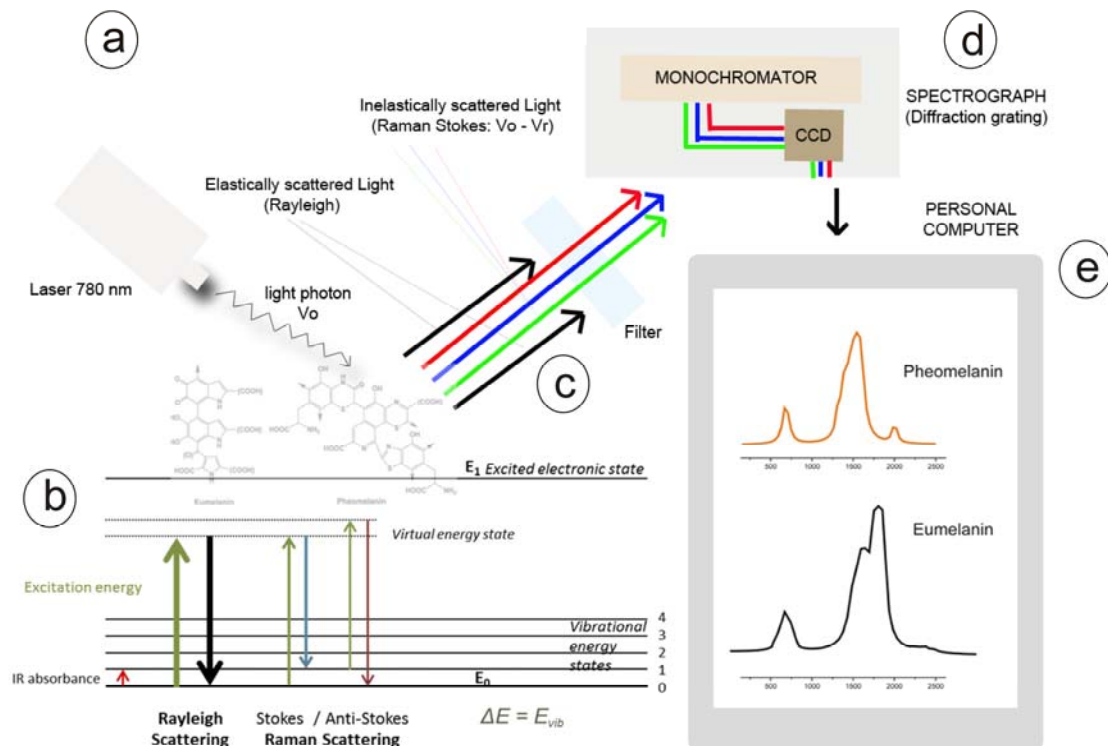


Fig. 4.2. Esquema de un Espectroscopio Raman donde se muestran los componentes principales. Obsérvese que a partir de una fuente láser de frecuencia V_0 (a) se excitan las dos moléculas mayoritarias de melaninas pasando del estado fundamental a un estado virtual de energía $V_0 - V_r$ (b), un filtro se encarga de eliminar las componentes frecuenciales no deseadas (c), las distintas longitudes de onda dispersadas de ambas moléculas pasan a un espectrógrafo (d) formado por un monocromador (difraction grating) que separa espacialmente las distintas longitudes de onda dispersadas y un detector CCD encargado de digitalizar las señal para enviarla posteriormente a un PC donde un software será capaz de representar por pantalla los datos captados por el CCD visualizándose los dos espectros inequívocos a modo de huellas dactilares : uno con las frecuencias vibracionales características de la eumelanina y otro con las frecuencias vibracionales características de la feomelanina (e).

4.3. Análisis de los datos

El trabajo que se ha desarrollado en el gabinete ha estado enfocado en tres vertientes principales:

1. Selección de taxones.

La selección de las listas de especies de interés no fue trivial, se debía de evaluar previamente el nivel de conocimiento de aspectos clave de su ecología,

biología, última posición filogenética conocida, su disponibilidad en las diferentes colecciones entomológicas y el estado de conservación de las mismas. Por ello, atendiendo al denominado “criterio experto”, y a las líneas de trabajo que los grupos de investigación de mis directores llevan realizando, se optó por seleccionar una serie de taxones específicos donde se podrían comprobar las hipótesis ecomorfológicas planteadas en los objetivos de esta tesis incluyendo especies que representan todas las historias de vida conocidas para el orden (herbívoros, ecto y endo parasitoides, depredadores, polinizadores, especies sociales y solitarias) y abarcando una amplia gama de sustratos de los que emergen los adultos (sin ocultar, en plantas o en el suelo).

2. Procesado, codificación y análisis de los caracteres morfológicos para su estudio.

En cuanto a la codificación y clasificación de caracteres morfológicos observables, todos los artículos que componen esta tesis tienen un apartado específico donde se detalla el criterio utilizado generalmente basados en trabajos anteriores, pero adaptándolos a la variabilidad observada y también basados en el portal web del proyecto The Hymenoptera Anatomy Ontology (HAO) (The Hymenoptera Anatomy Ontology 2014; Yoder et al., 2010). Huelga añadir que, entre los caracteres morfológicos analizados, unos han sido binarios y discretos y, por lo tanto, relativamente sencillos de codificar, sin embargo, otros han sido menos claros (Stevens, 1991). Esto es especialmente cierto para los datos continuos realizados (medidas) donde para obtener buenas estimaciones de variabilidad se ha intentado siempre analizar un necesario y suficiente tamaño muestral que ha ayudado a aplicar códigos binarios o multiestado (Archie, 1985).

3. Procesado estadístico de los datos obtenidos con las metodologías anteriormente detalladas.

Debido al elevado número de metodologías se ha empleado una gran diversidad de software científicos focalizados a obtener el mayor número de datos posible a partir de los análisis realizados. De esta manera destaca el software de microscopía, tanto de análisis de imágenes como de procesamiento de las mismas, como son: Helicon Focus 4.62.2 para la fotografía y análisis de imagen de microscopio estereoscópico; Scandium 5.0 de Olympus Company para el procesamiento de imágenes del microscopio electrónico. The Microanalysis Inca Suite v.4.09 de Oxford Instruments Analytical para el procesamiento de espectros de Rayos X con EDS y OMNIC v.8.0 de Thermo para análisis de espectros de Raman. OriginPro 8.0 de Origin Lab Corporation se han empleado para el análisis estadístico de datos y representación gráfica de los espectros de Raman. XLSTAT se ha utilizado como software para todos los otros análisis estadísticos (gráficos de dispersión, análisis multivariante, ANOVA, análisis de regresión y ANCOVA)

Asimismo, cabe destacar el software aplicado al montaje de imágenes vectoriales y edición de imágenes ráster como son: Corelraw X6 de Corel Corporation para imágenes vectoriales; adobe Photoshop CS4 extended de Adobe Systems Incorporated para imágenes ráster.



Do not go gentle into that good night

*Do not go gentle into that good night,
Old age should burn and rave at close of day;
Rage, rage against the dying of the light.
Though wise men at their end know dark is right,
Because their words had forked no lightning
they*

*Do not go gentle into that good night.
Good men, the last wave by, crying how bright
Their frail deeds might have danced in a green
bay,*

*Rage, rage against the dying of the light.
Wild men who caught and sang the sun in flight,
And learn, too late, they grieved it on its way,*

*Do not go gentle into that good night.
Grave men, near death, who see with blinding sight
Blind eyes could blaze like meteors and be gay,*

*Rage, rage against the dying of the light.
And you, my father, there on the sad height,
Curse, bless, me now with your fierce tears, I pray.*

*Do not go gentle into that good night.
Rage, rage against the dying of the light.*

Dylan Thomas

Interstellar of Christopher Nolan (2014)

V

Resultados y discusiones

Capítulo I

Spectral cathodoluminescence analysis of Hymenopteran mandibles with different levels of zinc enrichment in their teeth

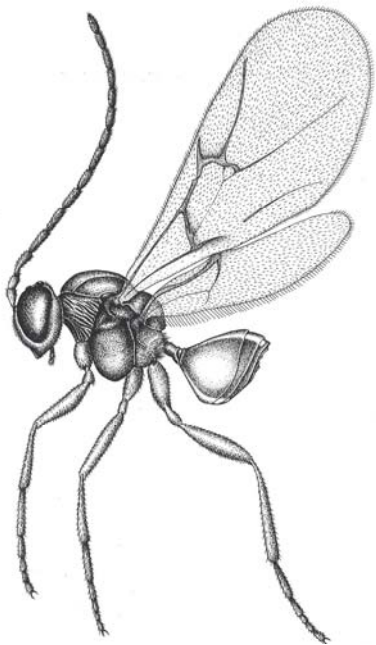
*"Dos caminos divergen en el bosque, y yo,
yo tomo el menos transitado, eso ha hecho
toda la diferencia".*

Robert Frost



5.1.1. Resumen

La inclusión de Zn en las mandíbulas de los insectos afecta a su dureza y a su uso en las funciones de alimentación y reproducción. Sin embargo, se sabe poco sobre la base química/estructural del enriquecimiento de Zn. En este artículo hemos encontrado que la técnica de cátodoluminiscencia (CL) es útil para revelar diferentes tipos de espectros CL en las mandíbulas de los himenópteros, dependiendo del nivel de enriquecimiento de Zn (evaluado por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS)). Los individuos que no tenían o solo tenían trazas de Zn en sus dientes mandibulares ($\leq 3\%$ en peso) presentaban una amplia banda de luminiscencia en el rango visible que se parecía a los observados en las estructuras C-C de grafito. Este espectro es probablemente característico de la cutícula no enriquecida, ya que no difiere de las obtenidas a partir de la parte interna de mandíbulas con ausencia de Zn. Por el contrario, los individuos con un porcentaje de moderado a alto de Zn en sus dientes mandibulares ($\geq 7\%$ en peso) presentaron bandas CL adicionales en el rango ultravioleta. Las comparaciones con diferentes minerales de Zn sugieren que estas bandas podrían estar relacionadas con enlaces O-Zn-O, con grupos hidroxilo y con enlaces de zinc-cloro (de acuerdo con sus altos niveles detectados por el EDS). Siendo una técnica no destructiva, la técnica de cátodoluminiscencia permite amplios estudios comparativos de la química de la cutícula enriquecida con metales en insectos, incluso utilizando especímenes únicos, como los depositados en los Museos de Historia Natural.



Publicación

Habitus Plagiotrochus australis. (Mayr, 1882)

Spectral cathodoluminescence analysis of hymenopteran mandibles with different levels of zinc enrichment in their teeth

Alberto Jorge¹, Carlo Polidori^{2,3}, Javier Garcia-Guinea⁴, José Luis Nieves-Aldrey⁵

¹Laboratorio de Microscopía, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, E-28006, Madrid, Spain

²Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Avenida Carlos III, s/n, E-45071 Toledo, Spain

³Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), Departamento de Biología Animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, C2-P3 Campo Grande, 1749-016, Lisboa, Portugal

⁴Departamento de Geología, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, E-28006, Madrid, Spain

⁵Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, E-28006, Madrid, Spain

La versión publicada de este artículo se encuentra en la revista *Arthropod Structure & Development* (46: 39-48, DOI: 10.1016/j.asd.2016.07.001)

5.1.2. Abstract

The inclusion of Zn in insect mandibles affects their hardness and is functional to their use during feeding or reproducing. However, little is known on the chemical/structural base of Zn enrichment. Here, we found that cathodoluminescence (CL) technique revealed two different types of CL spectra in the mandibles of Hymenoptera, depending on the Zn enrichment level assessed by Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS). Individuals having negligible traces to low % of Zn in their mandible teeth (≤ 3 wt%) presented a wide band of luminescence in the visible range which resembled those observed in the C-C structures of graphite. This spectrum is probably characteristic for un-enriched cuticle, since it did not differ from those obtained from the Zn-lacking inner part of mandibles. Individuals with moderate to high % of Zn in their mandible teeth (≥ 7 wt %), instead, presented additional CL peaks in the ultraviolet range. Comparisons with different minerals of Zn suggest that these peaks could be related with O-Zn-O bonds, with hydroxyl groups and with zinc-chlorine links (in agreement with their high levels detected by the EDS). Being a non-destructive technique, CL allows large comparative studies of the chemistry of metal-enriched insect cuticle even using unique specimens, such as those deposited in Natural History Museums.

Key words: cathodoluminescence; cuticle; wasps; bees; mandibles; transition metals; non-destructive techniq..

5.1.3. Introduction

Cuticle of all insects, which includes most of the material of the exoskeleton, has a common fundamental structure and consists of a procuticle of up to few hundreds μm , comprising chitin filaments disposed within a protein matrix, and an upper non-chitinous epicuticle of less than 2 μm , composed of lipids and proteins (Neville, 1975; Andersen, 1979). Nevertheless, cuticle is extremely variable in terms of composition, thickness, stiffness, strength, elasticity and colour (Vincent, 2002; Vincent & Wegst, 2004), in part due to the different degrees of stabilization and structuring occurring during the sclerotization process, in which certain aromatic organic compounds are incorporated into the cuticle proteins. From the pioneer studies on the chemical base of sclerotization (see Pryor, 1940) to the more recent analyses on incorporation of phenolic compounds and chemistry of hydrocarbon profiles in the epicuticle (reviewed by Andersen, 2010; Blomquist & Bagnères, 2010), much effort was done to shed lights on insect cuticle structure and composition, and on their relationships with life-history traits.

From early studies in the 80's (Hillerton & Vincent, 1982; Hillerton *et al.*, 1984) and especially in the last 20 years, many researchers have focused on a particular feature of the arthropod (and to a lesser extent non-arthropod) cuticle, i.e. the incorporation of transition metals such as Zn, Cu, Mn, Fe and of halogens in certain organs such as mandibles, ovipositors, and chelicera (e.g., Schofield & Lefevre, 1989; Quicke *et al.*, 1998; Schofield *et al.*, 2002; Lichtenegger *et al.*, 2003; Polidori *et al.*, 2013). Such arthropods seem to have benefits in possessing organs enriched of metals, because an enriched cuticle increases its hardness and wear resistance, and thereby allows a better and longer performance in cutting hard substrates such as those of seeds, leafs or other modified plant tissues (e.g., galls) or wood, which are used as oviposition sites and/or food (Vincent, 2002; Lichtenegger *et al.*, 2003;

Schofield & Lefevre; 1989; Quicke *et al.*, 1998; Fontaine *et al.*, 1991; Birkedal *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2003; Schofield *et al.*, 2002; Schofield *et al.*, 2003; Cribb *et al.* 2008a; Hillerton & Vincent, 1982; Fawke *et al.*, 1997; Kundanati & Gundiah, 2014). For example, in ants (Schofield *et al.*, 2002), termites (Cribb *et al.*, 2008b) and certain marine polychaetes (Lichtenegger *et al.*, 2003), the hardness of the mandible teeth have been correlated with the content of Zn, and the experimental removing of Zn considerably decreases their hardness (Broomell *et al.*, 2006). Halogens such as Cl are often co-located with Zn in these organisms (Lichtenegger *et al.*, 2003; Schofield *et al.*, 2003; Birkedal *et al.*, 2006). Comparative studies also suggest that metal enrichment in the cuticle is beneficial to organisms with certain life-histories. Indeed, species which do not reproduce or feed in hard substrates tend to lack transition metals, while closely relative species with prolonged activity of cutting or drilling in hard substrates during their life present such metals (e.g., Cribb *et al.*, 2008b; Morgan *et al.*, 2003; Polidori *et al.*, 2013; Kundanati & Gundiah, 2014).

However, despite the many reports of metal enrichment in different insect organs, still little is known about its chemical/structural base. It has been observed that certain metals such as Zn showed no mineral formation within the cuticle (Broomell *et al.*, 2006) and some authors have preliminary proposed that the biochemical form of Zn may involve binding proteins (Lichtenegger *et al.*, 2003; Birkedal *et al.*, 2006; Broomell *et al.*, 2006; Schofield, 2001). Nevertheless, other authors highlight that mineralization processes as phosphating, silicification and carbonation are very common in biological systems, having these phenomena been observed in animals as different as Hemiptera (Garcia-Guinea *et al.*, 2011), corals (Sanchez-Munoz *et al.*, 2009), echinoderms (McClintock *et al.*, 2011) and molluscs (Baronnet *et al.*, 2008). Because it is believed that mineralization processes are responsible for major adaptive radiations in

evolutionary history, it cannot be completely excluded that they are also linked with cuticle Zn enrichment.

The use of novel analytical techniques could help in a better understanding of metal enrichment in biological structures. For example, beyond bioluminescence, which was studied in a wide range of taxa (e.g., Lloyd, 1983; Viviani, 2002), the improved spatial resolution and efficiency of modern luminescence spectrometers coupled to electron microscopes could provide details of luminescent emission centres of insect cuticle. Cathodoluminescence technique (CL) is a non-destructive method in which spectral emission of light is produced by irradiating the surface of a solid by an electron beam. CL basic processes involve the excitation of an electron to a higher energy state followed by emission of a photon with energy λ ranges of ultraviolet (UV), visible or infrared (IR) when the electron returns to the lower energy state. The depth of penetration of the electrons in CL mode and therefore the depth of excitation depends on the energy of the electrons and is usually between 2 and 8 microns (Götze & Kempe, 2009), thus adequate to reach the procuticle of insects. However, as far as we know, CL analysis in insects was only applied to date to unveil the presence of ossification vesicles with calcium phosphate in the eyes of a hemipteran bug (Garcia-Guinea *et al.*, 2011). In contrast, CL was largely used in the last decade to study structures of other organisms, such as shells in molluscs and thallus in algae (see Barbin, 2013).

In the present study we analyzed the relationship between the Zn enrichment in the mandibles of Hymenoptera, evaluated with electron microscopy and microanalysis of energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS), and the spectra obtained through CL spectroscopy, to help unveiling how Zn incorporation may affect the cuticular structure. To reach such objectives we analysed CL spectra and chemical-elemental compositions of individuals with different Zn concentrations, together with Zn-bearing

luminescent minerals for comparative purposes. With this mainly methodological study we aimed to provide new technical elements that can be used in future comparative ecological and evolutionary investigations.

5.1.4. Materials and methods

We selected four historical-international zinc minerals kept in the reserve of the Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) (Madrid, Spain) (MNCN) and two commercial zinc compounds: hydrozincite ($Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$), sphalerite (ZnS), zincite (ZnO), smithsonite ($ZnCO_3$) and commercial compounds such as zinc chloride (ZnCl) and zinc sulfate ($ZnSO_4$). Details about the origin of the analyzed minerals are available in Table 5.1.S1.

We selected female individuals from a total of 11 species of Hymenoptera spanning 6 super-families and 10 families of bees and wasps (Table 5.1.1) for the study of mandibles.

Table 5.1.1. Taxonomic position of the studied specimens, with biological traits of the species they belong and origin of sample. * indicates individuals for which the inner parts of the mandible was also analysed in addition to mandible teeth. ^ indicates species for which we analyzed three individuals.

Superfamily	Family	Species	Biology	Origin of sample
Cynipoidea	Cynipidae	<i>Andricus hispanicus</i> (Hartig)	Gall-former <i>Quercus</i>	on JLNA, Spain
Cynipoidea	Cynipidae	<i>Eschatocerus acaciae</i> Mayr	Gall-former <i>Prosopis</i>	on JLNA, Argentina
Chalcidoidea	Ormyridae	<i>Ormyrus papaveris</i> (Perris)	Parasitoid of gall-wasps	JLNA, Spain
Ichneumonoidea	Ichneumonidae	Ichneumonidae sp. * ^	Parasitoid (undetermined host)	CP, Italy

Capítulo I: Cátodoluminiscencia espectral en Hymenoptera

Apoidea	Crabronidae	<i>Philanthus triangulum</i> (Fabricius) *	Predatory wasp on honeybees	CP, Italy
Apoidea	Apidae	<i>Xylocopa (L.)</i> ^	Polylectic bee	CP, Spain
Apoidea	Andrenidae	<i>Andrena (Scopoli)</i> <i>agilissima</i>	Oligolectic bee on Brassicaceae	CP, Italy
Apoidea	Halictidae	<i>Sphcodes monilicornis</i> (Kirby)	Cuckoo bee on other bees	CP, Italy
Vespoidea	Vespidae	<i>Discoelius (Panzer)</i> <i>zonalis</i>	Predatory wasp on caterpillars	CP, Italy
Vespoidea	Mutillidae	<i>Nemka (Pallas)</i> * <i>viduata</i>	Parasitoid of digger wasps	CP, Spain
Chrysoidea	Chrysididae	Chrysididae sp.	Parasitoid of wasps and bees	CP, Italy

Biologically, these species span a wide range of life-histories, including parasitoid wasps, predatory wasps, gall-forming wasps, and both pollen-foraging and pollen-stealing (cuckoo) bees (Table 5.1.1). Because our aim was to evaluate the CL method as a tool to study Zn enrichment, and not to test differences between species, we used one individual *per* species, spanning a wide range of Zn concentration based on previous published observations on related taxa (Quicke *et al.*, 1998; Polidori *et al.*, 2013). Zn content variability is known to be typically very low within species (Polidori *et al.*, 2013); however, for two of the selected species (see Table 5.1.1), we also analyzed three females each and evaluated the degree of intra-specific variation in Zn % and CL spectrum. Differences were minimal (see Supporting Information, Fig. 5.1.S1). In addition to mandible teeth, for three species (see Table 5.1.1) we also analyzed the

inner part of mandibles, which is never enriched with Zn in Hymenoptera, to include a “control” CL spectrum to compare both mandible types, i.e., Zn-containing and Zn-lacking. Specimens, belong to the collections, preserved in 99% ethanol, of authors CP and JLNA (Table 5.1.1). Prior to the analyses, specimens were air-dried for 15-20 min, and then their mandibles were dissected under a light microscope and mounted on adhesive carbon pads attached to aluminium stubs for the subsequent analyses. Mandibles used in this study are deposited at MNCN.

The micromorphology, topography, and distribution of metals were determined using a Philips FEI INSPECT (Hillsboro, Oregon, USA), an environmental scanning electron microscope (ESEM) at the MNCN. This ESEM can work at low vacuum conditions, allowing analyzing samples without previous preparation, i.e. gold-coating or dehydrating. The ESEM resolution operating at low-vacuum was at 3.0 nm / 30 kV (SE), 4.0 nm / 30kV (BSE) and < 12 nm / 3 kV (SE). The accelerating voltage was at 200 V – 30 kV and the probe current up to continuously adjustable 2µA. To obtain comparative analytical results, we always worked in a low-vacuum mode with a backscattered electron detector (BSED) under vacuum conditions of 30 Pa, a high voltage of 20 kV, a suitable beam spot diameter for particular magnifications and to achieve good focus and astigmatism correction, and a working distance of approximately 10 mm to the detector. A picture of one mandible for each of the studies specimens was also taken with the ESEM, prior to the X-ray energy microanalysis.

The X-ray energy microanalysis (EDS) of the samples was conducted with an energy-dispersive X-ray spectrometer (INCA Energy 200 energy dispersive system, Oxford Instruments). EDS analysis was performed on selected points on the mandibles, as it was previously performed in similar works (Morgan *et al.*, 2003; Polidori *et al.*, 2013; García-Guinea *et al.*, 2011). This allowed us to establish not only which elements were present but also the concentration of each element, which

required an accurate intensity measurement for each peak in the spectrum (Roomans *et al.*, 1988). The energies of electrons in the shells (atomic energy levels) are sharply defined with values characteristic of a specific element. The energy difference between electron shells is a specific value for each element. The characteristic X-ray lines are named according to the shell in which the initial vacancy occurs and the shell from which an electron drops to fill that vacancy. For instance, if the initial vacancy occurs in the K shell and the vacancy filling electron drops from the adjacent (L) shell, a $K\alpha$ X-ray is emitted. If the electron drops from the M shell (two shells away), the emitted x-ray is a $K\beta$ X-ray. Similarly, if an L-shell electron is ejected and an electron from the M-shell fills the vacancy, $L\alpha$ radiation will be emitted.

We used the maximum peak intensities obtained by a least-squares fitting routine that used standard peaks correlated to a spectrum of known compounds (Packwood, 1991). After these intensities were determined, matrix corrections were applied (Pouchou & Pichoir, 1991) to determine the concentration of each element. This correction method uses approximated exponential curves and the ϕ (ρZ) model to describe the shape of the curves. Thus, improved measurements of light elements in a heavy-element-rich matrix and samples that are tilted in the direction of the incident electron beam can be obtained (Pouchou *et al.*, 1991). The correction factors are dependent on the sample composition (which is the object of our analysis), so that the actual concentrations must be derived using an iterative procedure (Donovan & Tingle, 1996). The software used for the quantification was Microanalysis Suite, INCA suite version 4 (Oxford Instrument).

Assuming that the EDS technique provides semi-quantitative results, we ranked the recorded Zn % values, in accordance with previous comparative studies (Quicke *et al.*, 1988; Polidori *et al.*, 2013). The Zn % analytical results were ranked as 0 (<1 wt%), 1 (1-5 wt%), 2 (6-10 wt%), 3 (11-20 wt%) and 4 (>20 wt%). Rank 0 included those

cases in which Zn content was below the detection limits of the sample analysis, i.e. when the weight percentage of Zn was not greater than three times the weight percentage of the sigma value resulting from the analysis (Polidori et al., 2013). In those cases, Zn was considered to be present in negligible traces. In the rare cases of Mn detection, values were generally very low but still above the error threshold, and in these cases, % weight percentages < 1 were considered as significant traces.

Spectral CL emission can be observed with a variety of electron beam instruments (Petrov, 1996). Our approach was to mount a spectrometer onto the ESEM device. These couplings typically collect light with a mirror that is usually on a retractable arm and the light was measured using a grating-type spectrometer (Katona et al., 2004; Vernon-Parry et al., 2005). The ESEM has a coupled CL spectrometer Gatam MonoCL3 which records CL spectra and panchromatic and monochromatic plots with a PA-3 photomultiplier attached to the ESEM.

A retractable parabolic diamond mirror and a photomultiplier tube were used to collect and amplify luminescence. The sample is placed below the bottom of the mirror assembly at a distance from the detector that has an optimum quantum efficiency for CL. The excitation for CL measurements was provided at 30 kV electron beam and beam current of 100 μ A. The wavelength calibration was based on a standard mercury lamp. Acquisition of CL spectra was done between 250-750 nm for insects; however, for the minerals case, we expand the spectral range up to 250-850 nm because they have more intense CL emission. In preliminary tests, only noise signals were detected for insects in the infrared tail of the spectrum at wavelengths > 750 nm. The ASCII files of the CL spectra were processed with Origin software version 8.0 (OriginLab, USA, 2002).

Monochromatic images recorded at selected wavelength positions were obtained inserting a monochromator between microscopy and detector. The following

wavelengths were chosen for the monochromatic images: 290 and 376 nm (maximum intensity of UV luminescence transitions), and 431, 466, 578 and 724 nm (luminescence transitions of visible range), allowing to analyze the spatial distribution of radiation centers responsible for such emissions.

Because the actual spectrum peak intensities (i.e. number of counts) recorded by the CL analysis are affected by the overall intensity signal (which can be different among specimens), the raw peak counts (p) for the 250-750 nm range at 2-nm interval were first transformed as $p/\Sigma(p)\times 100$, to make the spectra comparable between specimens.

Comparisons between the tooth and inner part of mandible, across individuals and between individuals and minerals were done by identifying common high peaks, and then searching in the literature for the probable chemical nature of such peaks. Then, to improve the main peaks identification and associated comparisons, the CL spectra were analysed by a Reference Deconvolution Method, which circumvent distortions affecting all the spectral peaks in the same way; for the deconvolution calculations we used a well-known reference signal with identical lineshape distortions (Morris et al., 1997). Once the lineshape distortion was removed, the spectrum was then reconvoluted with a Lorentzian lineshape, obtaining an ideal lineshape (Middendorf, 1974).

5.1.5. Results

Zincite (ZnO), smithsonite (ZnCO₃) and zinc chloride (ZnCl₂) presented luminescence in the UV range (Fig. 5.1.1A, C, E), while zinc sulfate (ZnSO₄), hydrozincite (Zn₅(CO₃)₂(OH)₆) and sphalerite (ZnS) only presented luminescence emission in the visible range (Fig.5.5.1B, D, F).

Concerning the UV luminescent minerals, zinc oxide has a wide band at 384 nm (3.36 eV) and emits an efficient UV emission at ambient temperature (Bagnall *et al.*, 1998). Smithsonite has two luminescence centers, one in the red at 652nm (1.90 eV) due to the substitution of Mn^{2+} by Zn^{2+} , and the other one in the UV range at 354 nm (3.50 eV) due to intrinsic structural alterations into the crystalline lattice observed in various carbonates (Marshall, 1988; Gotte & Richter, 2004) probably related with O-Zn-O bonds in the lattice (Nishido *et al.*, 2013) or non-bridging oxygen centres (Garcia-Guinea *et al.*, 2009b).

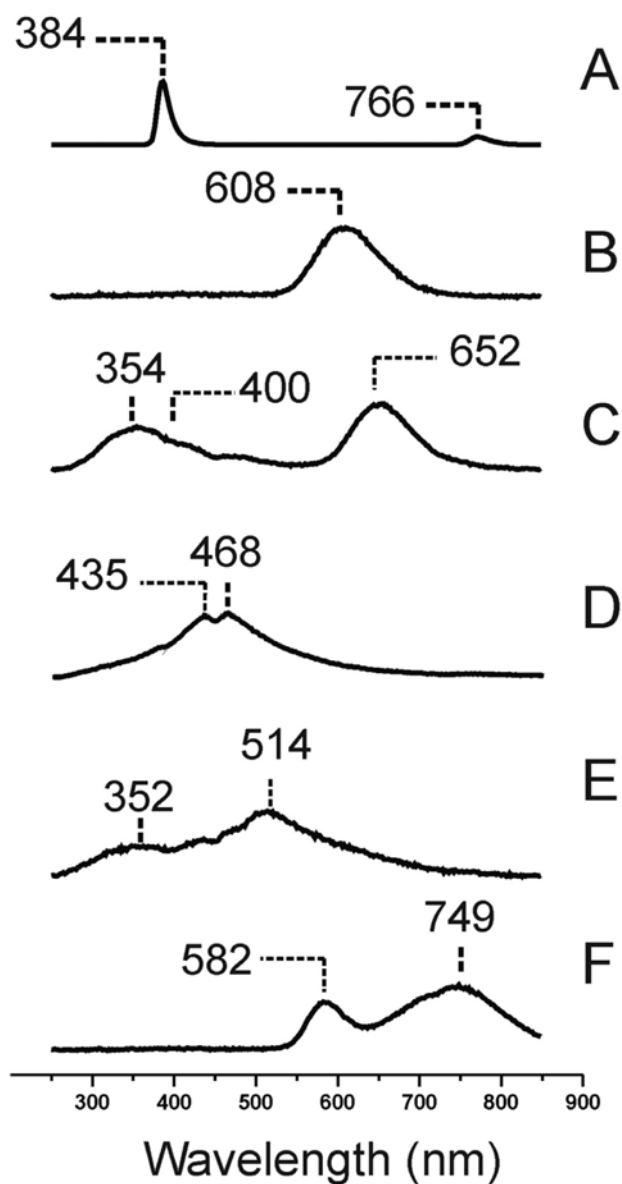


Figure 5.1.1. Spectral cathodoluminescence plots of minerals and compounds with Zn. A) zinc oxide (ZnO); B) zinc sulfate (ZnSO₄); C) smithsonite (ZnCO₃); D) hydrocincite ((Zn₅(CO₃)₂(OH)₆); E) zinc chloride (ZnCl₂) F) sphalerite (ZnS). Note the signals in the ultraviolet region for zinc oxide, zinc carbonate and zinc chloride (250-400 nm).

To the best of our knowledge the luminescence of zinc chloride was not described in detail; this compound presents a luminescence emission in the UV region with a peak at 352 nm (3.52 eV), similar to the observed in smithsonite, and a strong luminescence emission in the visible range at 514 nm (2.41 eV) (Fig. 5.1.1E). Similarly to ZnO, ZnCl₂ presents a bacteriostatic effect at certain concentrations and pH conditions (Padmavathy and Vijayaraghavan, 2008).

The EDS analysis showed that in the apical part (tooth) of the mandibles, specimens from Chalcidoidea (>20 wt%) and Cynipoidea (11-20 wt%) have high concentrations of Zn, while specimens from Chrysididae, Ichneumonidae and Mutillidae (Vespoidea) have lower but appreciable Zn concentrations (3-10 wt%) (Table 5.1.2 and Fig. 5.1.2).

Table 5.1.2. Values of Zn, Mn and Cl (wt %) as obtained through the X-ray energy microanalysis, and Zn ranks, in the mandibles of the study individuals. Note that Zn % < 1 denotes non-significant presence of the metal (negligible traces), while for Mn 0 % denotes negligible presence and “traces” denotes abundance < 1% but still above the threshold limit for significant presence (3 × Sigma value, see text). Also for Cl 0% denotes negligible presence.

Species	% Zn	Zn rank	% Mn	% Cl
<i>Andrena agilissima</i> (Scopoli)	< 1	0	0	0
<i>Andricus hispanicus</i> (Hartig)	18	3	0	2
Chrysididae sp.	8	2	0	1
<i>Discoelius zonalis</i> (Panzer)	< 1	0	0	0
<i>Eschatocerus acaciae</i> Mayr	18	3	1	6
Ichneumonidae sp.	3	1	0	0
<i>Nemka viduata</i> (Pallas)	7	2	0	4
<i>Ormyrus papaveris</i> (Perris)	34	4	traces	5
<i>Philanthus triangulum</i> (Fabricius)	< 1	0	0	0
<i>Sphecodes monilicornis</i> (Kirby)	< 1	0	0	0
<i>Xylocopa violacea</i> (L.)	< 1	0	0	0

On the other hand, specimens from Apoidea and the remaining members of Vespoidea have negligible Zn concentrations (<1 wt%) (Table 5.1.2 and Fig. 5.1.2). One individual falls in the Zn rank 4, two in the rank 3, two in the rank 2, one in the rank 1 and five in the rank 0 (Table 5.1.2). On the other hand, Mn was only detected with low values in Chalcidoidea (in traces) and *Eschatocerus acaciae* (Cynipoidea) (1 wt%).

Given the rare occurrence and the low values, we did not carry out further analyses for such metal. In the basal-inner part of the mandibles, as expected, no metals were detected (Fig. 5.1.S2). Specimens having high Zn enrichment (≥ 7 wt%) also presented significant abundance of Cl (Table 5.1.2).

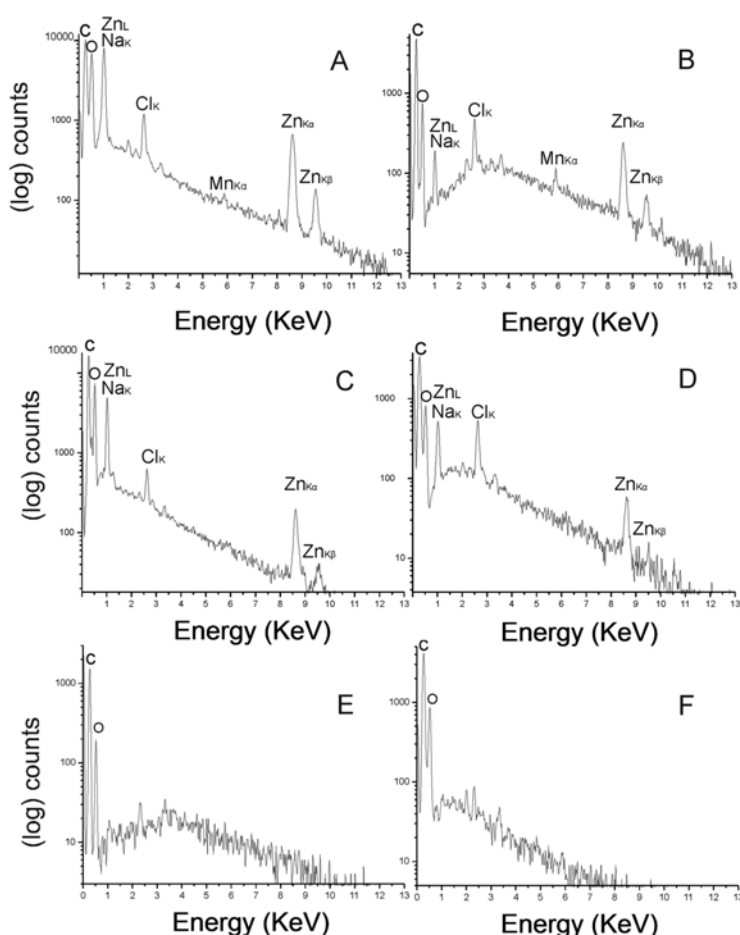


Figure 5.1.2. Representative spectra (on logarithmic scale) from X-ray energy dispersive analysis of mandible teeth, generated with a primary electron beam energy of 20 keV. A) *O. papaveris*, B) *E. acaciae*, C) *A. hispanicus*, D) *N. viduata*, E) *P. triangulum*, F) *X. violacea*. For X-ray lines of Zn, the $L\alpha$ has an energy of 1.0 keV, $K\alpha$ X-ray has an energy of 8.6 keV and the $K\beta$ X-ray has an energy of 9.6 keV. For X-ray lines of Mn, the $K\alpha$ has an energy of 5.9 keV. For X-ray lines of Cl, the K-shell has an energy of 2.6 keV and the K-shell of Na has an energy of 1.0 keV. Note the correlation between Zn and the halogen Cl in EDS spectra.

When comparing the ESEM pictures (Fig. 5.1.3A, C, E) and the panchromatic luminescence images (Fig. 5.1.3B, D, F) of the mandibles, no differences appeared in the spatial distribution of emission centers across species with high or low Zn concentration; however, in the ESEM pictures a whiter area in the teeth clearly identified where Zn atoms are located in the specimens with moderate to high Zn concentrations.

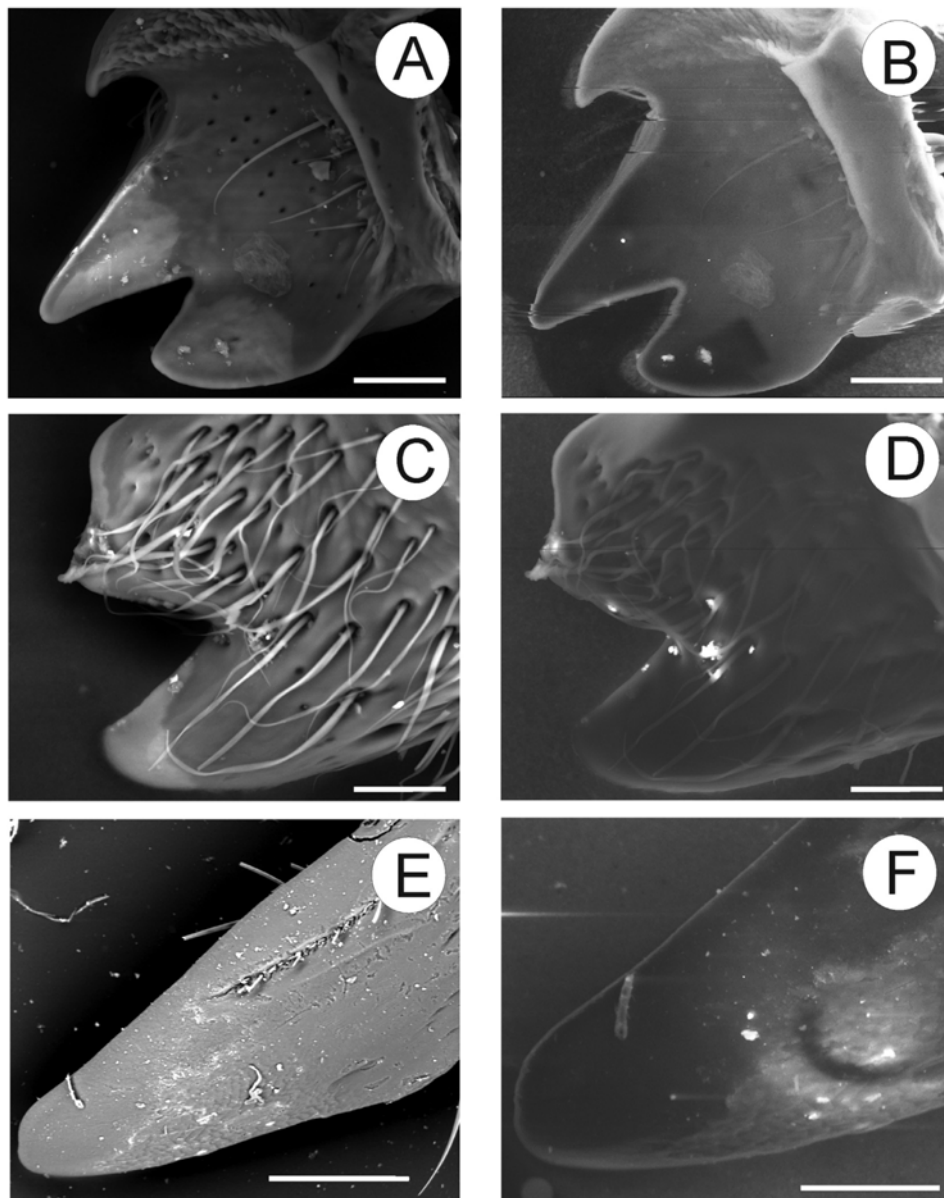


Figure 5.1.3. Backscattered images (A, C, E) and panchromatic-CL images (B, D, F) of mandible teeth prepared with solid state reaction method under the Environmental Scanning Electron of some representative species studied. Note the whiter outer areas of the teeth, which correspond to Zn-enriched areas the SEM pictures. A-B) *E. acaciae*, C-D) *A. hispanicus*, E-F) *P. triangulum*. Bar: 50 μ m.

The CL analysis of the studied specimens revealed two main types of CL spectra. Specimens with $Zn \leq 3$ wt% presented a wide band of intense luminescence at 450-700 nm (visible range) (Fig. 5.1.4E, F, G), with CL spectra very similar to those obtained from the Zn-lacking inner part of the mandible (Fig 5.1.S2). On the other hand, specimens with $Zn \geq 7$ wt% present important additional peaks. A narrow band peaked at 290 nm (UV range) (Fig. 5.1.4A, B, C, D) similar to the peak described in hydroxylated minerals, was found in these specimens. Specimens with $Zn \geq 7$ wt% also presented a clear UV region at 350-380 nm of CL emission (Fig. 5.1.4A, B, C, D), which has a clear similarity with features in the same spectral region observed in smithsonite, generally attributed to non-bridging oxygen centres (NBOC) (Fig. 5.1.1C).

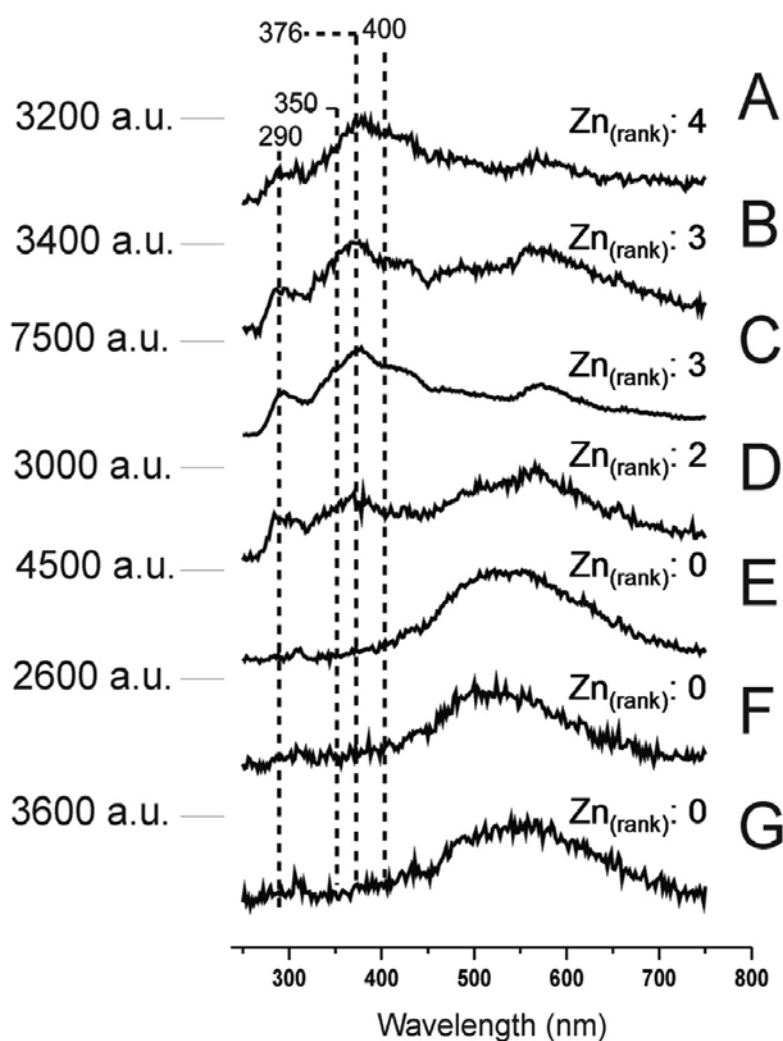


Figure 5.1.4. Cathodoluminescence (CL) spectra of the mandible teeth of some of the studied individuals. A) *O. papaveris*, B) *E. acaciae*, C) *A. hispanicus*, D) *N. viduata*, E) *A. agilissima*, F) *X. violacea*, G) *P. triangulum*. The rank for Zn %, as obtained with X-ray energy dispersive analysis, is also shown. Note the ultraviolet region (250-400

Furthermore, within this UV range, in the same species a clear peak was detected at 376 nm, a position similar to the Zn band gap peak at 384 nm described for the zinc oxide (Fig. 5.1.1A). A peak detected at circa 350 nm resembles the 352 nm of ZnCl₂, in good agreement with the co-occurrence of Zn and Cl in Zn-enriched mandibles. Changes of CL spectra seems to correspond to an increase of Zn % above 7 wt%, as can be seen by comparing the Ichneumonidae sp. specimen (3 wt %, rank 1) with Chrysididae sp. specimen (8 wt%, rank 2) (Fig. 5.1.S3).

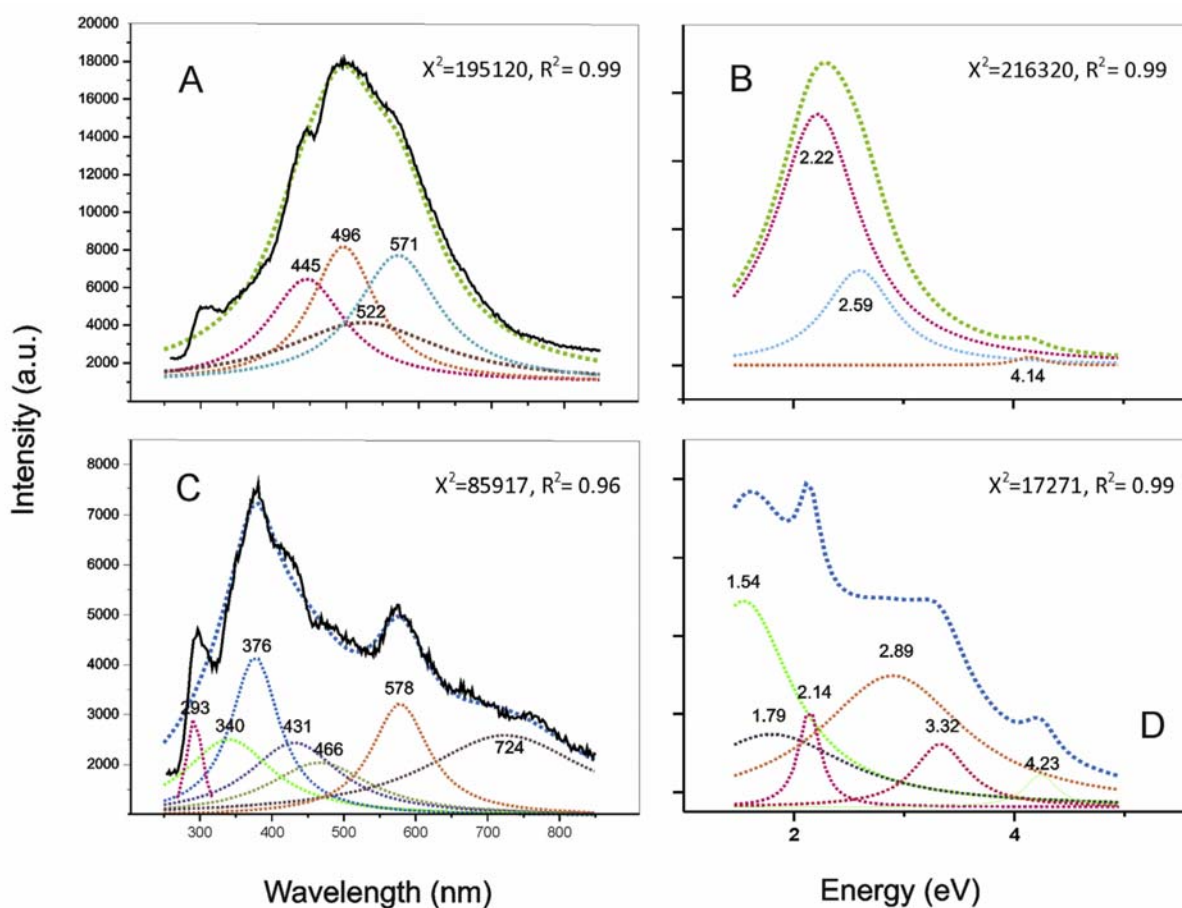


Figure 5.1.5. Cathodoluminescence (CL) spectra of inner part of mandible (no Zn-enrichment) in the top diagram (A, B), and of mandible tooth (Zn-enrichment) in the lower part of the diagram (C, D), for one individual of *A. hispanicus*, with high level of Zn enrichment. The diagrams A and C were recorded in wavelength and transformed in to wavelength plots, and the diagrams B and D show how these transform into energy plots by Lorentzian deconvolution of curves. Note that the intensity of the blue peak at about 376 nm is well correlated with energy band gap of ZnO at circa the 3.36 eV.

The Reference Deconvolution Method revealed up to six luminescence centres contributing to the global signal of strongly Zn-enriched mandible teeth, with three spectral CL bands as follows: 376 nm (3.32 eV) (similar to the UV band gap of ZnO), 293 nm (4.23 eV) (similar to UV OH-groups) and 578 nm (2.14 eV), the latter similar to one of the three main peaks of the visible spectral range occurring in non-Zn-enriched specimens (Fig. 5.1.5).

From the monochromatic pictures taken with electron-beam excitation filtered at six different wavelengths it is possible to detect a major intensity (mostly at the cutting edge of teeth) at 376 and secondarily within the visible range (431-578 nm) (Fig. 5.1.S4). A very low luminescence emission arises at 290 nm (UV), and no luminescence was observed in the infrared region (724 nm) in any part of the mandible (Fig. 5.1.S4).

5.1.6. Discussion

The chemical nature of cuticle-hardening factors, such as metal incorporation, is still relatively poorly known. Here we show that cathodoluminescence spectral analysis (CL) can be a useful tool to help unveiling some of the structural and chemical bases of metal enrichment.

Our CL analysis have revealed that hymenopteran specimens with Zn \geq 7 wt% present CL spectra with peaks within the UV range at 352, 354 and 376 nm, consequently revealing similarities with ZnCl₂, ZnCO₃, and ZnO, respectively. The band at 354 nm (3,50 eV) was observed in different carbonates and could be related with NBOC centres of the Zn-O-Zn bonds in mineral lattices, despite this effect cannot be visualized in the energy diagram; in contrast, the band gap of ZnO at 376 nm (3.32 eV) is well visible in this diagram (Fig. 5.1.5C-D). For the rest of the specimens, both those lacking significant Zn accumulation and those having low levels of Zn

accumulation (≤ 3 wt%) the CL spectra resemble those of minerals with abundant C-C links in the visible range (400-700 nm). This luminescence band is similar to those observed in C-C links of graphites or coals in where the presence of polynuclear aromatic hydrocarbons was also described (Kostova *et al.*, 2012). This type of CL spectrum was also found in the Zn-lacking inner part of those mandibles having Zn-enriched teeth. Thus, it can be inferred that a significant structural change of cuticle in hymenopteran mandibles is not linked with the mere presence of Zn, but that it only occurs if Zn has relatively high concentration (i.e. ranks 2-4). The Reference Deconvolution method supports the hypothesis that the structural change driven by high % of Zn are very similar among taxa, apparently independently from their phylogenetic position. For example, wasps in the family Mutillidae and those in the family Cynipidae are in two distant groups (Vespoidea and Cynipoidea) and had similar CL spectra driven by high Zn enrichment, while *Discoelius zonalis* (Panzer), which is more closely related to Mutillidae (it is also in Vespoidea) showed the typical CL spectrum of non-enriched mandibles. The role of phylogenetic relationships on CL spectra diversity should be however further ascertained enlarging the number of individuals per species, species, genera and families. We can also exclude the effect of body size on metal concentration. For example, *N. viduata* and *S. monilicornis* have similar body size (body length 5-15 mm and 7-10 mm respectively) (Bogusch & Straka, 2012; Lelej & Schmid-Egger, 2005) but differ greatly in the Zn concentration. Previous works also suggest no links between body size and Zn level: for example, the large woodwasp *Urocerus gigas* (>20 mm, Benson (1943)) have Zn in the mandibles, while the very small fig wasp *Elisabethiella stueckenbergi* (Chalcidoidea) (<2 mm, Al-Beidh *et al.* 2012) lacks Zn (Quicke *et al.*, 1998).

The rare occurrence of Mn, and with very low, albeit in few cases significant, concentration in the studied species makes difficult to hypothesize if it may also affect

the cuticular structure. At low %, apparently its presence does not affect CL spectra. Indeed, specimens having both high % of Zn and significant % of Mn present similar CL spectra of those with high % of Zn but lacking Mn. This feature is interesting since Mn was observed in the mandibles and ovipositors of different insect species within a variety of lineages, such as Coleoptera, Isoptera and Hymenoptera (see Quicke *et al.*, 1998, Fontaine *et al.*, 1991, Morgan *et al.*, 2003, Stewart *et al.*, 2011, Polidori *et al.*, 2013), and it was suggested that Mn-enriched cuticle shows an increased density and a better resistance to fracture (Morgan *et al.*, 2003) as a consequence of the stress into the biopolymer structure provided by the Mn^{2+} cation. It is known that even Mn ²⁺ concentrations of less than 10 ppm are easily detected through spectral CL analysis at 615 nm (Barbin, 2013) as occurs when cation groups are bonded into the polymer lattice (e.g., carbonate). Hence, it is possible that the very low Mn contents analyzed in our study species do not bond with the polymer lattice; as a consequence, we cannot exclude that higher Mn concentrations may produce alterations visible through CL analysis. Experiments with species possessing higher Mn % would help in testing for this hypothesis.

Cuticular structures enriched with Zn often present a parallel high concentration of halogens as Cl (Schofield, 2001). Despite Cl is difficult to quantify in large and thick samples, like insect mandibles, because the low-energy x-rays are easily absorbed, in our study this coupling seems to be true, since individuals with moderate to high % of Zn always were associated with significant % of Cl. The presence of Cl was not associated with Mn presence in our samples, since species with high % of Zn but lacking Mn exhibit significant % of Cl. The CL spectra suggested that the presence of Cl may modify the cuticle structure in the UV range, particularly at 352 nm. The Zn-Cl association may provide a better equilibrium between hardness and resistance to fracture and wear, and because Cl is known to have high peroxidase activity

(Lichtenegger *et al.*, 2002), it could also provide a protective layer on the mandibles against bacteria and fungi. The strict link between Zn and Cl is suggested also by the fact that, in other Hymenoptera (ants), Cl is incorporated in the mandibles at the same time as Zn (i.e. after pre-ecdysial tanning) (Shofield *et al.*, 2003). Additionally, the cuticle can contain Cl originating from the ecdysial fluid during cuticle secretion, and Cl likely occurs within pore canals (Andersen *et al.*, 1996; Andersen, 2010).

As highlighted in previous works, an interesting characteristic of insect cuticle is that water not only is used for the cuticle synthesis but also for the maintenance of its structure and functional properties (Vincent, 2002; Vincent, 2009). In fact, water is an important modulator of mechanical properties of cuticle, e.g. its hardness is affected by water concentration (e.g., Hillerton *et al.*, 1982). CL spectra from our studied specimens showed that when Zn-Cl % are high there is a strong change of luminescence at 290 nm (UV range), which suggests the quite homogeneous presence of water molecules similar to those occurring in the regular crystalline structure of Zn(OH)₂. This spectral peak can be attributed to oxygen vacancies probably related with hydroxyl groups (OH) which stress oxygen bonds and consequently produce UV spectral emission (García-Guinea *et al.*, 2009a; Kostova *et al.*, 2012; Willander *et al.*, 2009). However, the 290 nm peak may be not so important in explaining the Zn-driven structural change of mandible cuticle. In fact, this wavelength had a low signal detected in the monochromatic images. Further experiments should be carried out to formally test for the role of water and OH-groups in Zn-driven cuticle structural change.

Despite our study provides new insights on the possible structural changes that metal enrichment produces in insect cuticle, it is clear that many doubts still remain about the chemical origin of this change. It was indeed surprising how many luminescence sites can be detected with spectral CL analysis in hymenoptera mandibles, which should be further investigated. For example, while our comparison

between cuticle and minerals shed some lights on the possible chemical integration of Zn, we still cannot disregard possible mineral amorphous nanoclusters associated to protein structure. Previous studies showed a lack of crystalline matrix for Zn in insect mandibles, thus supporting alternative situations, e.g. the incorporation of Zn within a polymer matrix, possibly a protein (see Schofield, 2001; Lichtenegger *et al.*, 2003; Birkedal *et al.*, 2006). However, the high levels of Zn enrichment found in some of our studied individuals may suggest that, instead of being part of a protein complex, Zn may be present as a crystalline salt or into low-crystalline groups. In support of this hypothesis, other studies (Gibbs & Bryan, 1980; Lichtenegger *et al.*, 2002) reported high concentrations of Cu in a polychaete teeth, with this metal being present in a crystalline compound very similar to the mineral phase of atacamite ($\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$). In arthropod mandibles, potential biomineralization processes involving Zn and nucleating low-crystalline organometallic compounds cannot be excluded at the moment.

Metals, halogens, and even water could all contribute to the mechanical properties of cuticle, and their respective concentrations can alter their functional properties in a variety of ways that could be studied in further investigations. Besides the necessary further chemical investigations, the CL analysis is clearly useful as a starting point for comparative studies across arthropod taxa, or within taxa according to population, environment, age, and other intra-specifically variable traits.

Compared to destructive techniques used in the past to study structural and chemical composition of insect cuticle (see, e.g., Vincent & Wegst, 2004; Kumirska *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015), spatially-resolved spectral cathodoluminescence is a non-destructive technique providing novel insights on this topic even using precious, sometimes unique samples preserved in Natural History Museums, and thus allowing to incorporate museum collections for large comparative studies within evolutionary and ecological frameworks.

5.1.7. Supporting Information

Table 5.1.S1. Sources and details of the minerals used in the study.

Phase	Theoretical formula	Source	Treatment
Hydrozincite	$Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$	Reocin (Santander, Spain)	Natural, as received
Sphalerite	ZnS	Reocin (Santander, Spain)	Natural, as received
Smithsonite	ZnCO ₃	Aliva (Santander, Spain)	Natural, as received
Zinc Oxide	ZnO	Aliva (Santander, Spain)	ZnS heated 1000°C / 1d
Zinc chloride	ZnCl ₂	Merck Millipore (code 108816)	Commercial
Zinc Sulfate	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Merck Millipore (code 108883)	Commercial

Figure 5.1.S1. CL spectra for three individuals of *X. violacea* (A, B, C) and three of Ichneumonidae sp. (D, E, F). The rank for Zn %, as obtained with X-ray energy dispersive analysis, is also shown.

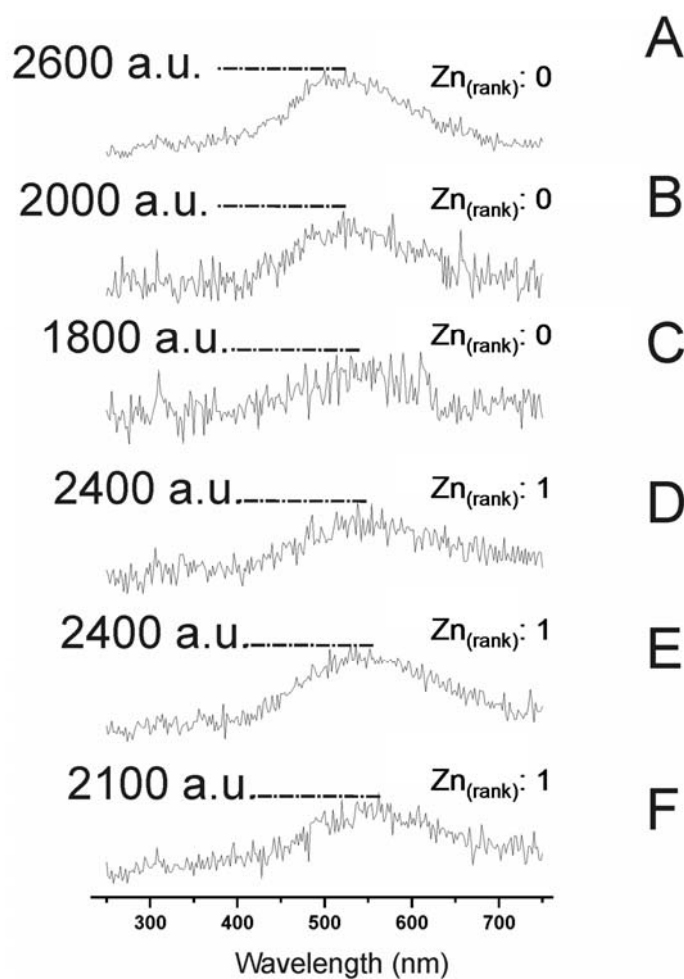


Figure 5.1.S2. CL spectra for inner part of mandibles of A) *A. hispanicus*; B) *N. viduata*; and C) *P. triangulum*. Note the broad band (450-700 nm) peaked at circa 600 nm typical in C-C structures.

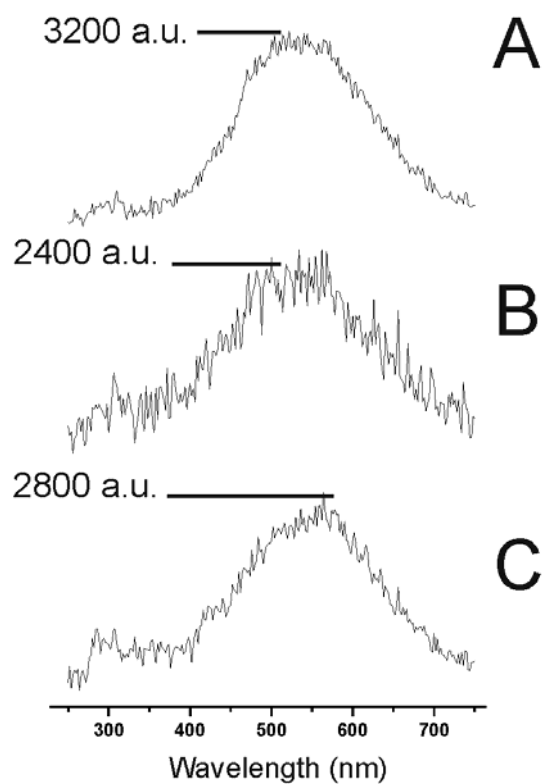


Figure 5.1.S3. CL spectra for Ichneumonidae sp. (A) and Chrysididae sp. (B), two species with, respectively, Zn rank 1 and 2 according to values obtained from the X-ray energy dispersive analysis. Note that only when Zn rank is ≥ 2 it is already possible to observe certain structural changes in the UV region.

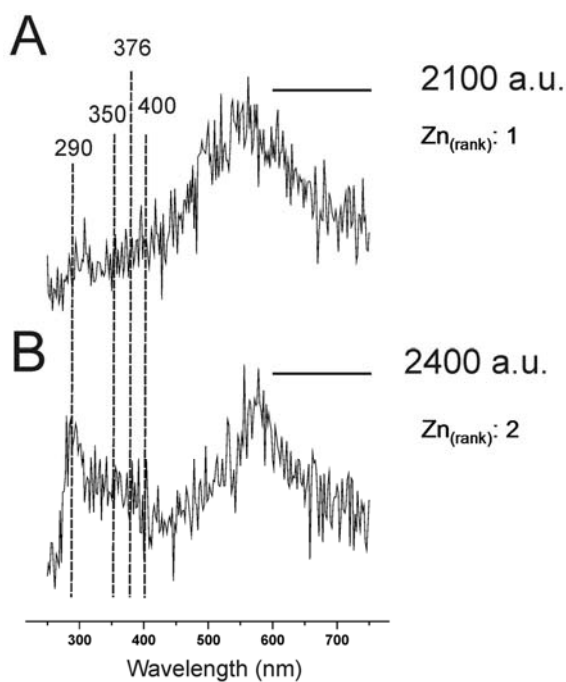
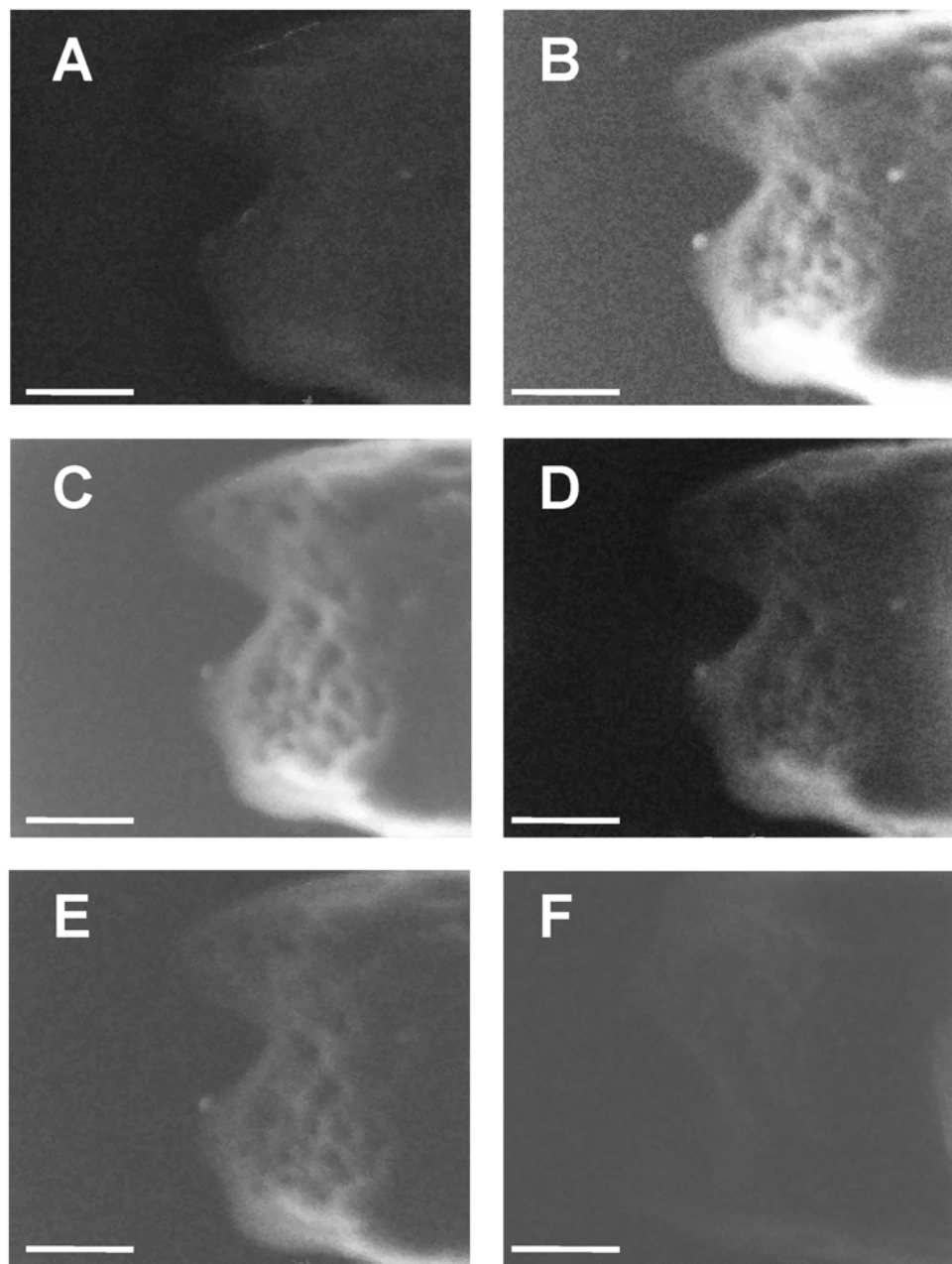


Figure 5.1.S4. Monochromatic-CL images of a mandible of *A. hispanicus*, a specie with high level of Zn enrichment. Up to six luminescent emission centers can be observed: A) 290 nm, B) 376 nm, C) 431 nm), D) 466 nm, E) 578 nm F) 724 nm. Bar: 50 μ m.

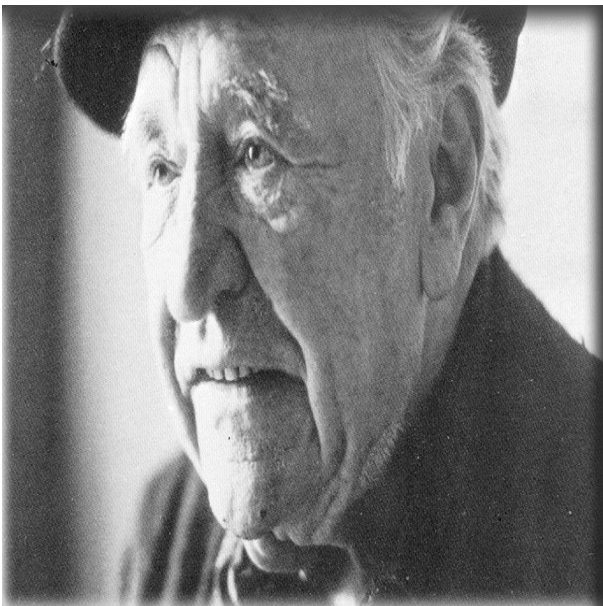


Capítulo II

Zn incorporation in the mandibles of Hymenoptera (Insecta): an adaptation to certain life-history traits?

*"A la calle, que ya es hora de
pasearnos a cuerpo y mostrar que,
pues vivimos, anunciamos algo
nuevo".*

Gabriel Celaya

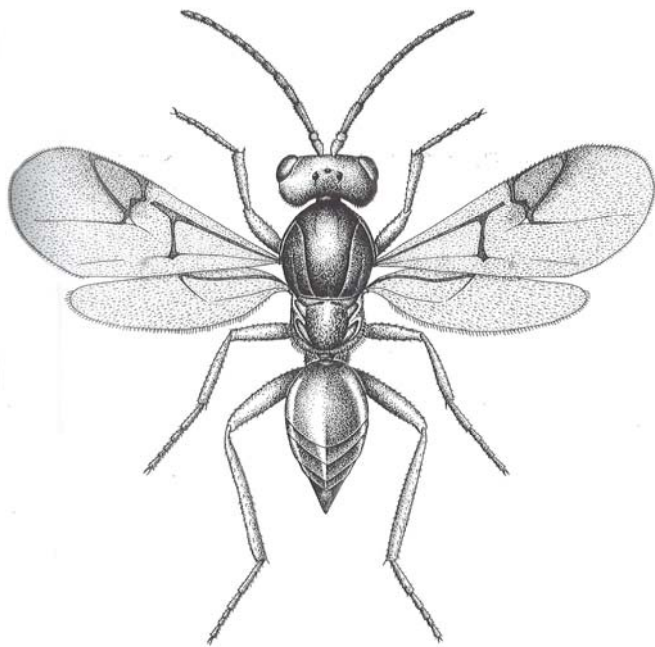


5.2.1. Resumen

En varios grupos de insectos las estructuras relacionadas con la alimentación y la ovoposición tienen una cutícula endurecida por la incorporación de metales, p. ej. el cinc (Zn). Dentro de los himenópteros (abejas, avispas y hormigas), se ha demostrado un vínculo entre el enriquecimiento de metales en el ovopositor y la dureza del sustrato de ovoposición en varios linajes, pero los posibles factores que han promovido la incorporación de metales en las mandíbulas no son conocidos. Los adultos usan las mandíbulas para alimentarse y excavar durante la emergencia o para construir los nidos, por lo que su composición también podría estar bajo selección por presiones ecológicas. Aquí, hemos utilizados datos de la incorporación de Zn en las mandíbulas de 96 especies de Hymenoptera que abarcan 65 familias y 24 superfamilias, para comprobar el efecto de rasgos biológicos clave en la variabilidad observada. Encontramos que el enriquecimiento de Zn es común en las mandíbulas de los himenópteros, con 65 de 96 especies que tienen entre 1% y 32% en peso de Zn. El Zn está ausente en las tres superfamilias de "Symphyta" más primitivas, mientras que está presente de forma variable en Apocrita (es decir, "Terebrantia" + Aculeata). Por ejemplo, se detecta Zn en la mayoría de los "Terebrantia" y en todas las familias de Chrysoidea, en Formicoidea y en Pompiloidea, pero está ausente en la mayoría de los Apoidea. Parece haber un efecto filogenético sobre la variabilidad observada. No está claro, por otro lado, si el enriquecimiento de Zn también depende de factores ecológicos. De hecho, aunque encontramos una asociación significativa entre el nivel de Zn y la dieta larvaria (larvas herbívoras son menos propensas a tener Zn que aquellas carnívoras), todas las avispas inductoras de las agallas tienen Zn. Además, las especies analizadas que emergen del suelo suelen no tener Zn, contrariamente con la hipótesis de que excavar a través de sustratos se asocia con un mayor % de

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

Zn. Por lo tanto, se necesitan nuevos datos para aclarar la evolución de este rasgo en los Hymenoptera.



Publicación

Habitus Diplolepis mayri (Schlechtendal, 1877)

Zn incorporation in the mandibles of Hymenoptera (Insecta): an adaptation to certain life-history traits?

Alberto Jorge¹, José Luis Nieves-Aldrey², Concepción Orrosa³, José Tormos³, Josep Daniel Asís⁴, Carlo Polidori⁵

¹ Laboratorio de Microscopia, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, ES-28006, Madrid, Spain

² Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, ES-28006, Madrid, Spain

³ Departamento de Biodiversidad, Ecología y Evolución, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 12, ES-28040 Madrid, Spain

⁴ Unidad de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Campus "Miguel de Unamuno" 37071, Salamanca, Spain

⁵ Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Avenida Carlos III, s/n; E-45071 Toledo, Spain

Artículo en preparación para su próxima publicación.

5.2.2. Abstract

In several groups of insects, structures related with feeding and oviposition are known to have a cuticle hardened by incorporation of metals such as Zn. Within Hymenoptera (bees, wasps and ants), a link between metal enrichment in the ovipositor and oviposition substrate hardness was proved in several lineages, but the possible factors which promoted metal incorporation in mandibles are not well understood. Mandibles are used by adults for feeding, digging and crawling at emergence, so that their composition may be also under selection through ecological pressures. Here, we used data on Zn incorporation in the mandibles of 96 species of Hymenoptera spanning 65 families and 24 superfamilies to test the effect of key life-history traits on the observed variability. We found Zn enrichment to be widespread in hymenopteran mandibles, with 65 out of 96 species having from about 1% to 32% wt of Zn. Zn lacked in the three most primitive “symphytan” superfamilies, while it is variably present in Apocrita (i.e. “Terebrantia” + Aculeata). For example, Zn often occurs in “Terebrantia” but it lacks in two out of five families of Proctotrupeoidea. Even larger variability was found within Aculeata, where Zn was found in all families of Chrysidoidea, in Formicoidea and in Pompiloidea, but it lacks (Vespoidea, Scolioidea, Thiphoidea) or it is extremely rare (Apoidea) in other lineages. Thus, there is a phylogenetic effect on the observed variability. It is unclear, on the other side, if Zn enrichment also depends on ecological factors. Indeed, although we found a significant association between Zn rank and larval diet (species with herbivorous larvae less prone to have Zn than those with carnivorous larvae), all gall-wasps have Zn. Furthermore, plants and unconcealed emerging sites were associated with greater Zn rank compared with emerging from soil, disagreeing with the hypothesis that digging through substrates is associated with greater % of Zn. New studies are thus necessary to clarify the evolution of this trait in Hymenoptera.

Key words: insect cuticle; Hymenoptera; metal; mandible; life-history; evolution.

5.2.3. Introduction

Despite a common structure, cuticle of arthropods is very variable in terms of chemical composition, thickness and mechanical properties such as stiffness and elasticity (Vincent, 2002; Vincent & Wegst, 2004). One of the most variable trait associated with cuticle structure concerns the presence of transition metals such as Zn, Mn and halogens (Hillerton & Vincent, 1982; Hillerton *et al.*, 1984) in certain areas of body parts (e.g. mandibles, ovipositors, and chelicera) (e.g. Schofield & Lefevre, 1989, Quicke *et al.*, 1998, Schofield *et al.*, 2002, Lichtenegger *et al.* 2003, Polidori *et al.*, 2013). These structures are extensively used in a variety of activity such as feeding, ovipositing, digging, and crawling as adults through the development site. Since these activities incur great energetic costs and lead to progressive wear of these organs, metal enrichment may be seen as an evolutionary successful modification, given its verified relationship with increased hardness and wear resistance (Broomell *et al.*, 2006; Cribb *et al.* 2008a).

This is particularly true if individuals have to cut or dig hard substrates such as those of seeds, wood, leaves or other modified plant tissues (e.g. galls) (Vincent, 2002; Lichtenegger *et al.* 2003; Schofield & Lefevre, 1989; Quicke *et al.*, 1998, Fontaine *et al.*, 1991; Birkedal *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2003; Schofield *et al.*, 2002; Schofield 2005; Cribb *et al.* 2008a; Hillerton & Vincent, 1982; Fawke *et al.*, 1997; Kundanati & Gundiah, 2014). While the chemical nature of metal incorporation is not fully understood, it was recently shown in the order Hymenoptera, through cathodoluminescence (CL) analysis, that only individuals having high % of Zn in their mandibles (≥ 7 wt%) presented CL peaks in the ultraviolet range, and comparisons with

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

different minerals of Zn suggest that these peaks could be related with O-Zn-O bonds, with hydroxyl groups and with zinc-chlorine links (Jorge *et al.* 2017).

Despite such considerations, studies which proved that the presence of transition metals in selected body parts evolved in responses to ecological pressures are scarce. Cribb *et al.* (2008b) showed that the presence of harder, Zn-enriched mandibles in dry wood termites appears to be related to the lack of free access to water to wet the wood. High concentrations of Zn and Mn were found in insect larvae mandibles that pierce seeds, but not in insect larvae mandibles that attack previously damaged seeds (Morgan *et al.* 2003). Ovipositors in species of gall wasps that lay eggs in hard parts of plants, as well as those of hard gall-parasitoids, have higher concentrations of Zn and/or Mn than those in species that create galls in softer parts of plants (Polidori *et al.*, 2013). Similarly, parasitoids of fig wasps into hard fig syconia have Zn-enriched ovipositors, while fig wasps themselves, which oviposit in flowers, do not (Kundanati & Gundiah, 2014). On the other side, there is some indication that the presence of metals in selected organs can be related to phylogenetic relationships, as in the case of mandibles of herbivorous insects (Hillerton & Vincent, 1982).

The insect order Hymenoptera (sawflies, parasitic wasps and the aculeate wasps, bees and ants) is an extremely specious group of insects which evolved an extreme diversity of life styles (Austin & Dowton, 2000; Nieves-Aldrey & Sharkley, 2014). Within Hymenoptera it is possible to find solitary as well as social species, most of the insect parasitoids, many predatory species with a varying degree of specialization, the most important pollinators (bees) and species with larvae which feed upon a variety of plant tissues (Austin & Dowton, 2000; Nieves-Aldrey & Sharkley, 2014). Such great variability in life-history traits makes thus this group of insects a good model to test the link between ecological pressures and morphological modifications. Concerning metal incorporation in the cuticle, the only comparative study that

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

considered species from many hymenopteran lineages is that of Quicke *et al.* (1998). This study is of special interest here because it was the first attempt to look for evolutionary links between ecology and metal incorporation in the order as a whole, and served as the starting point for the present study.

In particular, Quicke *et al.* (1998) found a reasonably clear evidence that metal enrichment in ovipositors is related with the type of oviposition substrate: except for parasitoid wasps in the family Bethyloidea, no metals were in fact detected in species that penetrate soft substrates or do not make holes at all. This association was later observed also within one single superfamily (Cynipoidea) (Polidori *et al.*, 2013). Conclusions, however, were more complicated for mandibles. Across about 50 species spanning 16 superfamilies, Quicke *et al.*, (1998) found Zn in the mandibles of all taxa with the exception of the two most basal lineages of the order (Pamphiliidae and Pergidae: “Symphyta”), the parasitoid family Pelecinidae (“Terebrantia”), and the Vespidae (Aculeata). Explanations for these exceptions are not conclusive (Quicke *et al.*, 1998), and the overall almost universally widespread Zn incorporation in the mandibles contrasts with the strongly variable material that has to be cut or dug during emerging, digging and/or foraging.

Because of this still unclear role of ecological factors in shaping mandible chemical composition, a possible alternative hypothesis is that the strongest predictor of whether a mandible contains metals may not be the species' ecology, but whether or not other members of its family also have such elements (Hillerton & Vincent, 1982; Hillerton *et al.*, 1984; Schofield, 2001). Phylogenetic relationships did not seem to affect distribution of Zn in the mandibles within families, as was observed for example for Cynipidae (Polidori *et al.*, 2013). Across families, on the other side, things remain unclear because many lineages were not considered in Quicke *et al.* (1998), so that it

is also possible that variability in this trait is greater than actually known and both phylogenetic and ecological effects may appear.

Here, we used an expanded sample of Hymenoptera species, families and superfamilies (overall almost doubling the taxonomic spectrum analysed by Quicke *et al.* (1998)) to investigate if key ecological factors (adult emergence substrate, larval feeding resource) and/or phylogenetic relationships may have had a role in the evolution of Zn incorporation in mandibles.

5.2.4. Materials and methods

Females of 96 species of Hymenoptera spanning 65 families in 21 superfamilies (representing >80% of the extant supra-generic taxa) were analysed (Table 5.2.1). The sample include both data retrieved from previous works (notably Quicke *et al.* (1998) but also Schofield *et al.* (2002)) and data from newly analysed taxa coming from the private collections of CP and JLN and from the collection of the Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) (Madrid, Spain) (MNCN). To avoid biases in species representation among lineages, we analysed maximum four species per family. The complete sample includes species representing all the life-histories known for the order (plant-feeders, ecto- and endo-parasitoids, predators, pollinators, social and solitary species) and spans a wide range of substrates from which adults emerge (Table 5.2.1). As in Quicke *et al.* (1998) we prefer to examine 1 individual per species of closely related taxa with similar biology rather than many individuals of the same species. Previous studies have shown that intra-specific variability in metal % is very low and even disappears after having ranked Zn% (see below) (Quicke *et al.* 1998, Jorge *et al.* 2017), so we think that our results are unlikely to be not affected by analysing a single individual per species.

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

No specific permissions were required for the locations/activities, since collections were done in non-protected areas. The field collections did not involve endangered or protected species.

Except for the few specimens coming from the Museum collection, that were introduced in the SEM without previous gold-coating, individuals were dissected under light microscopy and the excised mandibles were gold-coated after mounting on adhesive carbon pads attached to aluminum stubs.

The detection of metals were determined using a scanning electron microscope (SEM) Philips FEI INSPECT (Hillsboro, Oregon, USA) at the MNCN, working in a high-vacuum mode with a backscattered electron detector (BSED) under vacuum conditions of 30 Pa, a high voltage of 20 kV, a suitable beam spot diameter for particular magnifications and a working distance of about 10 mm to the detector. The X-ray energy microanalysis (EDS) of the samples was conducted with an energy-dispersive X-ray spectrometer (INCA Energy 200 energy dispersive system, Oxford Instruments) (e.g. Polidori et al. 2013). For each specimen, we performed a point-analysis, in which metal concentration was obtained at one point on the mandible tooth (the only area enriched of metals if these are present, see Quicke *et al.* (1998) and Polidori *et al.* (2013)).

To check for metal incorporation in their mandibles, we performed a semi-quantitative analysis by using the maximum peak intensities obtained by a least-squares fitting routine that used standard peaks correlated to a spectrum of known compounds. After these intensities were determined, matrix corrections were applied to determine the concentration of each element. To calculate the statistical error in the concentration, the weight percentage of the sigma value should be used to determine whether the element is below the detection limits of the sample analysis, and we apply

the condition that requires an element's weight percentage to be greater than three times the weight percentage of the sigma value resulting from the analysis. Further details of the whole procedure can be found in Polidori *et al.* (2013).

Since the analytical method of metal detection is semi-quantitative, we ranked all the obtained values. Zn was ranked as 0 = <0.1% wt; 1 = 0.1–1.0% wt; 2 = 1.0–5.0% wt; 3 = 5.0–10.0% wt and 4 = >10% wt (maximum value detected: 32%). This ranking procedure is the same used by Quicke *et al.* (1998). The % value of Zn for the single species retrieved from Schofield *et al.* (2002) was also ranked as above.

The ranked values were mapped on a hand-made phylogeny based on the recent molecular works of Peters *et al.* (2017) and Branstetter *et al.* (2017) (Fig. 5.2.1).

Each species was associated with the following traits: 1) larval feeding resource (only plant (0) or animal (completely or partially) (1)), and 2) emergence site material (unconcealed (0) plant (1), soil (2)). To test for association between life-history traits and metal concentration, we compared the distributions of Zn rank among the life-history categories, with a series of Kolmogorov-Smirnov tests.

5.2.5. Results

We found an important variability of Zn incorporation in the mandibles of Hymenoptera (Fig. 5.2.1, Table 5.2.1). The presence of Zn in the mandibles can be sometimes observed easily through the inspection of SEM pictures. Indeed, mandibles with Zn (particularly with ranks 3-4) clearly show the cutting edge and the apex (i.e. the areas where the metal occurs) of a whitish colour (Fig. 5.2.2). The X-ray energy microanalysis returned well-defined spectra in which the absence (Fig. 5.2.3) or presence (Fig. 5.2.4) of Zn is clearly visible (Fig. 5.2.3). Zn, when present, can be

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

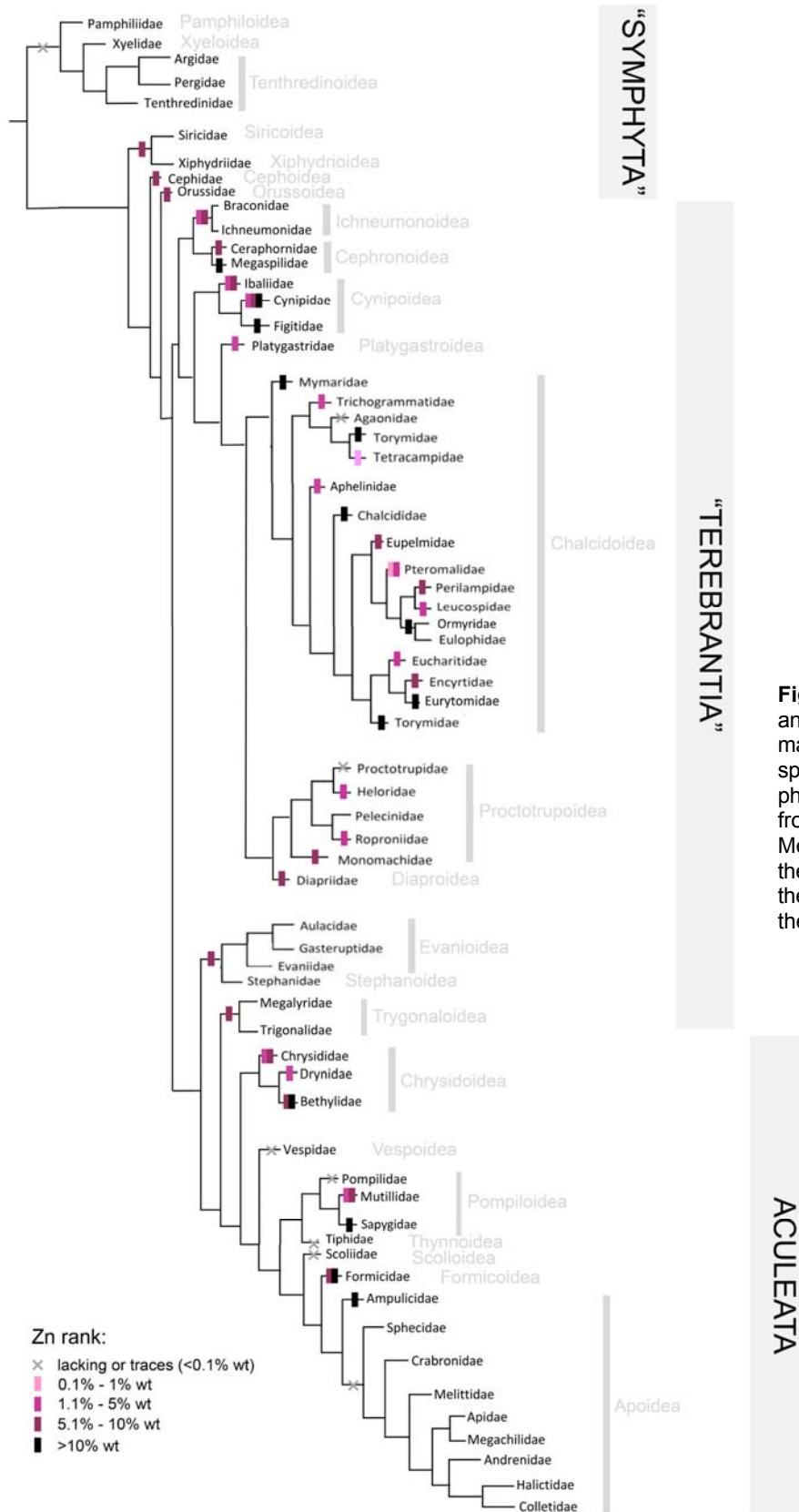


Figure 5.2.1. Occurrence and rank of Zn in the mandibles of the studied species, mapped on a phylogenetic tree derived from recent literature (see Methods). If >1 family share the same rank in a clade, the ran value was placed at their common ancestor.

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

Table 5.2.1. List of the taxa analysed in this study, together with their classification, the two key life-history traits used in the analysis, and the origin of the data. If data are original, it is specified the origin of sample: MNCN = collection of the Museo de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC), JLN-A = collection of José Luis Nieves-Aldrey, CP = collection of Carlo Polidori. Zn was ranked as 0 = <0.1% wt; 1 = 0.1–1.0% wt; 2 = 1.0–5.0% wt; 3 = 5.0–10.0% wt and 4 = >10% wt.

Suborder	Superfamily	Family	Species	% Zn (rank)	Larval resource (plant (0) or animal (1))	Emerging site (unconcealed (0) plant (1), soil (2))	Dara origin
"Symphyta"	Cephoidea	Cephidae	<i>Calameuta filiformis</i> (Eversmann)	3	0	1	Quicke et al. (1998)
"Symphyta"	Orussoidea	Orussidae	<i>Orussus sayii</i> Westwood	3	1	1	Quicke et al. (1998)
"Symphyta"	Pamphilioidea	Pamphiliidae	<i>Cephalcia arvensis</i> Panzer	0	0	0	Quicke et al. (1998)
"Symphyta"	Siricoidea	Siricidae	<i>Urocerus gigas</i> Linnaeus	3	0	1	Quicke et al. (1998)
"Symphyta"	Tenthredinoidea	Argidae	Argidae sp.	0	0	0	This study, JLN-A
"Symphyta"	Tenthredinoidea	Pergidae	<i>Phylacteophaga</i> sp.	0	0	0	Quicke et al. (1998)
"Symphyta"	Tenthredinoidea	Tenthredinidae	Tenthredinidae sp.	0	0	0	This study, JLN-A
"Symphyta"	Xiphydrioidea	Xiphydriidae	<i>Xiphidria</i> sp.	3	0	1	Quicke et al. (1998)
"Symphyta"	Xyeloidea	Xyelidae	Xyelidae sp.	0	0	0	This study, JLN-A
Apocrita	Apoidea	Ampulicidae	<i>Dolichurus corniculus</i> (Spinola)	4	1	0	This study, MNCN
Apocrita	Apoidea	Andrenidae	<i>Andrena agilissima</i> (Scopoli)	0	0	2	This study, CP
Apocrita	Apoidea	Andrenidae	<i>Andrena limata</i> Smith	0	0	2	This study, MNCN
Apocrita	Apoidea	Apidae	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus	0	0	1	This study, CP
Apocrita	Apoidea	Apidae	<i>Xylocopa violacea</i> Linnaeus	0	0	1	This study, CP
Apocrita	Apoidea	Colletidae	<i>Colletes abeillei</i> Pérez	0	0	2	This study, MNCN

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

Apocrita	Apoidea	Crabronidae	<i>Philanthus triangulum</i> Fabricius	0	1	2	This study, CP
Apocrita	Apoidea	Crabronidae	<i>Stizus continuus</i> (Klug)	0	1	2	This study, CP
Apocrita	Apoidea	Halictidae	<i>Halictus albomaculatus</i> Lucas	0	0	2	This study, MNCN
Apocrita	Apoidea	Halictidae	<i>Sphecodes monilicornis</i> (Kirby)	0	0	2	This study, CP
Apocrita	Apoidea	Megachilidae	<i>Megachile apicalis</i> Spinola	0	0	2	This study, MNCN
Apocrita	Apoidea	Megachilidae	<i>Rhodanthidium sticticum</i> Fabricius	0	0	2	This study, CP
Apocrita	Apoidea	Melittidae	<i>Dasypoda argentata</i> Panzer	0	0	2	This study, MNCN
Apocrita	Apoidea	Melittidae	<i>Melitta leporina</i> (Panzer)	0	0	2	This study, MNCN
Apocrita	Apoidea	Sphecidae	<i>Ammophila heydeni</i> Dahlbom	0	1	2	This study, MNCN
Apocrita	Apoidea	Sphecidae	<i>Isodontia mexicana</i> (Saussure)	0	1	2	This study, CP
Apocrita	Apoidea	Sphecidae	<i>Sceliphron curvatum</i>	0	1	2	This study, CP
Apocrita	Ceraphronoidea	Ceraphronidae	Ceraphronidae sp.	3	1	0	This study, JLN-A
Apocrita	Ceraphronoidea	Megaspilidae	Megaspilidae sp.	4	1	2	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Agaonidae	<i>Elisabethiella stueckenbergi</i> Grandi	0	0	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chalcidoidea	Aphelinidae	Aphelinidae sp.	2	1	0	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Chalcididae	Chalcididae sp.	4	1	0	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Encyrtidae	<i>Cerchysius subplanus</i> (Dalman)	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chalcidoidea	Eucharitidae	Eucharitidae sp.	2	1	1	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Eulophidae	Eulophidae sp.	4	1	1	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Eupelmidae	<i>Eupelmus spongipartus</i> Förster	3	1	1	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Chalcidoidea	Eurytomidae	Eurytomidae sp.	4	1	1	Quicke et al. (1998)

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

Apocrita	Chalcidoidea	Eurytomidae	<i>Sycophila biguttata</i> (Swederus)	4	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chalcidoidea	Leucospidae	<i>Leucospis</i> sp.	2	1	2	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chalcidoidea	Mymaridae	Mymaridae sp.	4	1	0	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Ormyridae	<i>Ormyrus nitidulus</i> (Fabricius)	4	1	1	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Chalcidoidea	Ormyridae	<i>Ormyrus papaveris</i> (Perris)	4	1	1	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Perilampidae	Perilampidae sp.	3	1	1	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Pteromalidae	<i>Philocaenus barbarus</i> Grandi	1	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chalcidoidea	Pteromalidae	<i>Pteromalus bedeguaris</i> (Thomson)	2	1	1	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Chalcidoidea	Roproniidae	<i>Ropronia</i> sp.	2	1	0	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chalcidoidea	Tetracampidae	Tetracampidae sp.	1	1	1	This study, JLN-A
Apocrita	Chalcidoidea	Torymidae	<i>Megastigmus stigmatizans</i>	4	1	1	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Chalcidoidea	Torymidae	<i>Torymus</i> sp. 1	4	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chalcidoidea	Trichogrammatidae	Trichogrammatidae sp.	2	1	0	This study, JLN-A
Apocrita	Chrysidoidea	Bethylidae	<i>Epyris niger</i> Westwood	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chrysidoidea	Bethylidae	<i>Pristocera depressa</i> (Fabricius)	4	1	1	This study, MNCN
Apocrita	Chrysidoidea	Chrysididae	<i>Omalus</i> sp.	3	1	2	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Chrysidoidea	Chrysididae	<i>Parnopes grandior</i> (Pallas)	2	1	2	This study, MNCN
Apocrita	Chrysidoidea	Dryinidae	Dryinidae sp.	2	1	0	This study, JLN-A
Apocrita	Cynipoidea	Cynipidae	<i>Andricus kollari</i> (Hartig)	4	0	1	This study, JLN-A
Apocrita	Cynipoidea	Cynipidae	<i>Ceroptres cerri</i> Mayr	3	0	1	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Cynipoidea	Cynipidae	<i>Diplolepis rosae</i>	2	0	1	Polidori et al. (2013)

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

Apocrita	Cynipoidea	Cynipidae	<i>Perclistus brandti</i>	2	0	1	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Cynipoidea	Figitidae	<i>Acanthaegilps sp.</i>	4	1	0	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Cynipoidea	Figitidae	<i>Neralsia sp.</i>	4	1	0	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Cynipoidea	Figitidae	<i>Parnips nigripes</i> (Barbotin)	4	1	1	Polidori et al. (2013)
Apocrita	Cynipoidea	Ibaliidae	<i>Ibalia drewseni</i> Borries	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Cynipoidea	Ibaliidae	<i>Ibalia rufipes</i> Cresson	2	1	1	This study, JLN-A
Apocrita	Diaprioidea	Diapriidae	<i>Trichopria verticillata</i> (Latreille)	3	1	0	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Diaprioidea	Monomachidae	<i>Monomachus sp.</i>	3	1	0	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Evanoidea	Aulacidae	<i>Pristaulacus sp.</i>	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Evanoidea	Evaniidae	<i>Evania sp.</i>	3	1	0	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Evanoidea	Gasteruptidae	<i>Gasteruption jaculator</i> (Tournier)	3	1	2	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Formicoidea	Formicidae	<i>Atta sexdens</i> Linnaeus	4	1	2	Schofield et al. (2002)
Apocrita	Formicoidea	Formicidae	<i>Formica sp.</i>	3	1	2	This study, CP
Apocrita	Formicoidea	Formicidae	<i>Messor sp.</i>	3	1	2	This study, CP
Apocrita	Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Archibracon servillei</i> Brulle	3	1	2	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Coeloides filiformis</i> Ratzeburg	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Eubazus sp.</i>	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Rhadinobracon sp.</i>	2	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Ichneumonoidea	Ichneumonidae	<i>Coleocentrus sp.</i>	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Ichneumonoidea	Ichneumonidae	Ichneumonidae sp.	2	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Ichneumonoidea	Ichneumonidae	<i>Perithous sp.</i>	3	1	2	Quicke et al. (1998)

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

Apocrita	Ichneumonoidea	Ichneumonidae	<i>Rhyssa persuasoria</i> (Linnaeus)	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Megalyroidea	Megalyridae	<i>Megalyra fasciipennis</i> Westwood	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Platygastroidea	Platygastridae	Scelionidae sp.	2	1	0	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Pompiloidea	Mutillidae	<i>Mutilla europea</i> Linnaeus	3	1	2	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Pompiloidea	Mutillidae	<i>Nemka viduata</i> (Pallas)	2	1	2	This study, CP
Apocrita	Pompiloidea	Pompilidae	<i>Anospilus orbitalis luctigerus</i> (Costa)	0	1	2	This study, MNCN
Apocrita	Pompiloidea	Pompilidae	<i>Arachnospila brevispinis</i> Wahis	0	0	2	This study, MNCN
Apocrita	Pompiloidea	Sapygidae	<i>Sapyga quinquepunctata</i> (Fabricius)	4	1	2	This study, MNCN
Apocrita	Proctotrupeoidea	Heloridae	<i>Helorus</i> sp.	2	1	0	This study, JLN-A
Apocrita	Proctotrupeoidea	Pelecinidae	<i>Pelecinus polyturator</i> (Drury)	0	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Proctotrupeoidea	Proctotrupidae	Proctotrupidae sp.	0	1	0	This study, JLN-A
Apocrita	Scolioidea	Scoliidae	<i>Scolia hirta</i> (Schrank)	0	1	2	This study, MNCN
Apocrita	Stephanoidea	Stephanidae	Stephanidae sp.	3	1	1	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Tiphioidea	Tiphidae	<i>Meria tripunctata</i> (Rossi)	0	1	2	This study, MNCN
Apocrita	Trigonaloidea	Trigonalidae	<i>Poecilogonalos costalis</i> (Cresson)	3	1	0	Quicke et al. (1998)
Apocrita	Vespoidea	Vespidae	<i>Discoelius zonalis</i> (Panzer)	0	1	2	This study, CP
Apocrita	Vespoidea	Vespidae	<i>Polistes dominula</i> (Christ)	0	1	1	This study, CP
Apocrita	Vespoidea	Vespidae	<i>Vespula germanica</i>	0	1	2	Quicke et al. (1998)

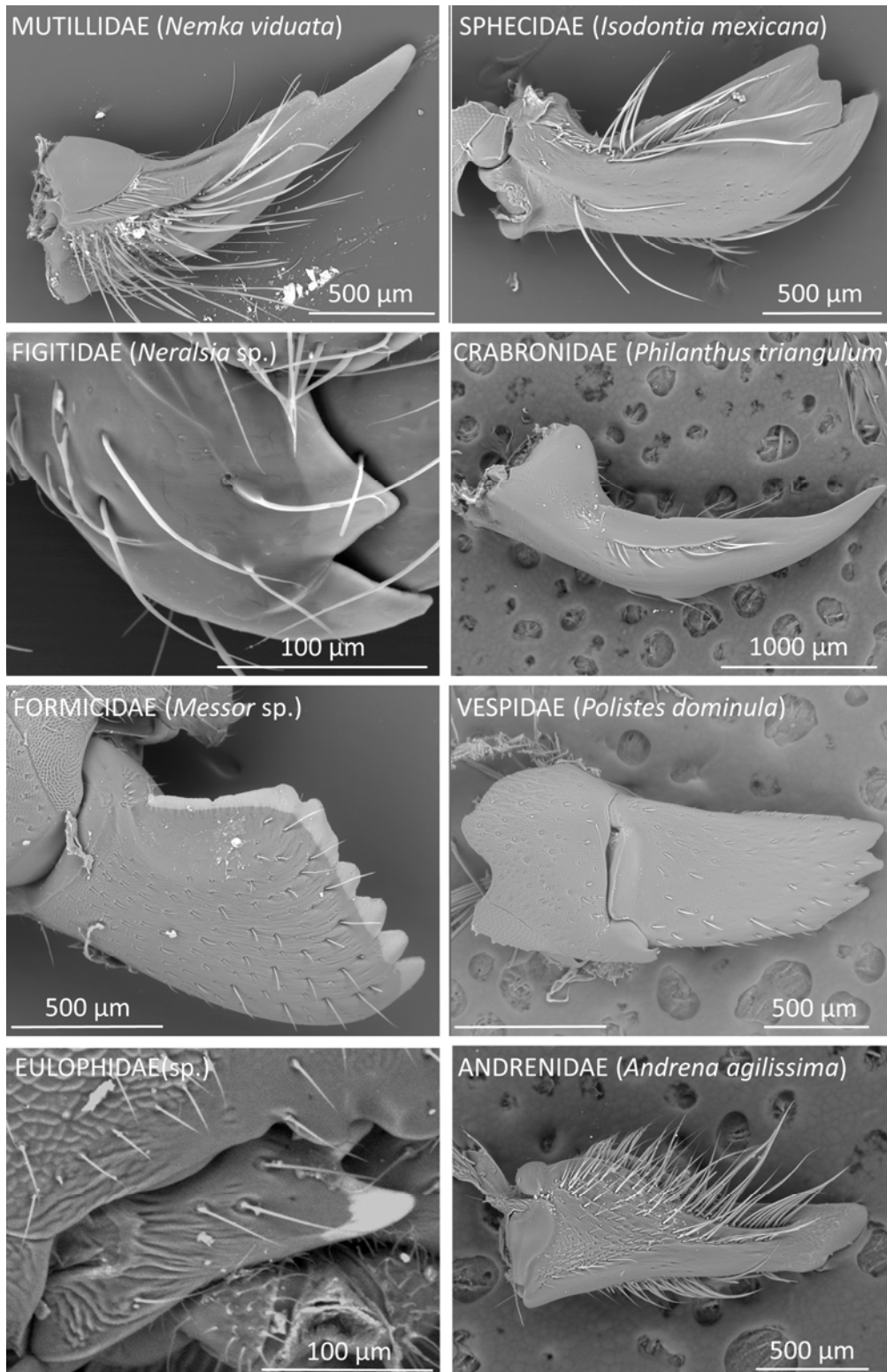


Figure 5.2.2. SEM pictures of the mandibles of some representative species studied. Note the whiter outer areas of the tooth, which correspond to Zn-enriched areas.

visible in the spectra both at 1.2 and 8.8 KeV (Fig. 5.2.4). Zn-enrichment is widespread in hymenopteran mandibles, with 65 out of 96 species having from about 1% to 32% wt of Zn detected with our method. Most of species possessing Zn fall into ranks 3-4 (47 out of 65). Low values of Zn % (rank 1) were only found in two species within the superfamily Chalcidoidea (Fig. 5.2.1, Table 5.2.1). When mapping metal enrichment into a phylogeny, some phylogeny-dependent trends appear (Fig. 5.2.1).

Zn lacked in the three most primitive “symphytan” superfamilies, while it variably present in Apocrita (i.e. “Terebrantia” + Aculeata). In fact, while Zn is ubiquitous in many lineages within “Terebrantia”, e.g. Cynipoidea, Ichneumonoidea, Evanoidea, and Chalcidoidea except Agaonidae), Zn lacks in two out of 5 families of Proctotrupoidea. Even larger variability is found within Aculeata, where Zn was found in all families of Chrysoidea, in Formicoidea (which include only the ants), and in two out of three families of Pompiloidea, but completely it completely lacks in Vespoidea, Scoliidea, Thiphoidea and Apoidea (including all bees) with the exception of the small parasitoid family Ampulicidae (Apoidea) (Fig. 5.2.1). Thus, some lineages seem to be more prone to have Zn in the mandibles.

Figure 5.2.3. Representative spectra of species lacking Zn in their mandibles, from X-ray energy dispersive analysis of mandible teeth, generated with a primary electron beam energy of 20 keV. The large peaks on the left correspond to Carbon and Oxygen, the basic elements of cuticles.

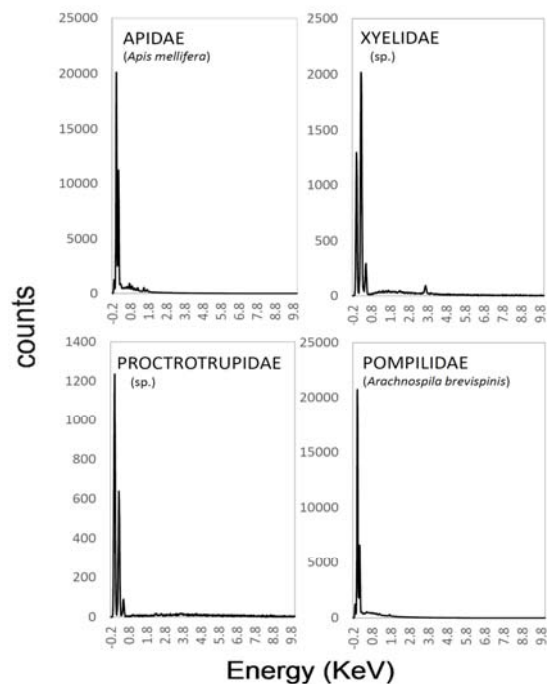
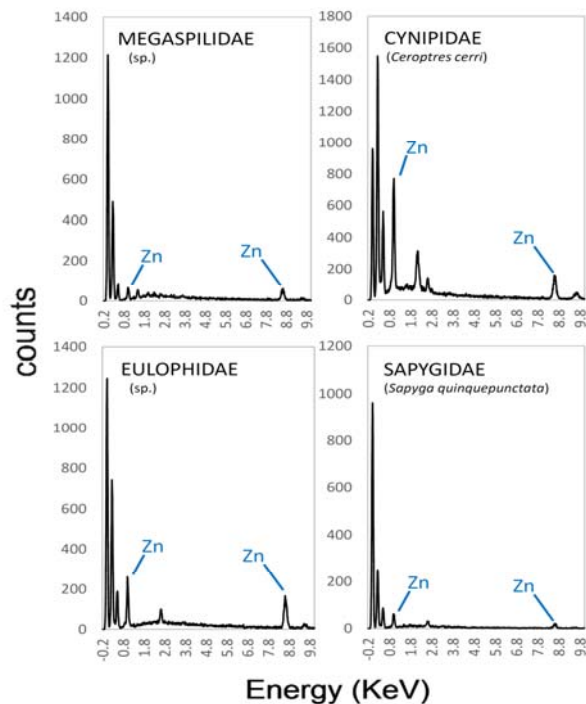


Figure 5.2.4. Representative spectra of species with Zn in their mandibles, from X-ray energy dispersive analysis of mandible teeth, generated with a primary electron beam energy of 20 keV. The large peaks on the left correspond to Carbon and Oxygen, the basic elements of cuticles.



On the other hand, this variability apparently did not seem to depend on ecological factors, or at least not on the life-history traits here considered. Indeed, although we found a significant association between Zn %wt (rank) and larval diet (Kolmogorov-Smirnov test: $D = 0.53$, $n = 96$, $P < 0.0001$), with species with herbivorous larvae (i.e. “Symphyta” + gall-wasps + bees) less prone to have Zn than carnivorous larvae, the fact that all gall-wasps have Zn makes this result complicated to explain in an ecological context. Concerning the emerging site substrate, plant emerging site was associated with greater Zn % compared with soil emerging site (Kolmogorov-Smirnov test: $D = 0.48$, $n = 96$, $P < 0.001$), thus not agreeing with the hypothesis that concealment play a role in shaping mandibles chemical composition. In fact, species emerging from soil almost invariably lacks Zn. The found difference among emerging sites seems more to be a product of the fact that most of unconcealed and plan-site species are within “Terebrantia”, thus may just reflect phylogenetic heritage. In fact,

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

species emerging from unconcealed sites did not differ in Zn% from those emerging from plants (Kolmogorov-Smirnov test $D = 0.20$, $n=96$, $P=0.59$)

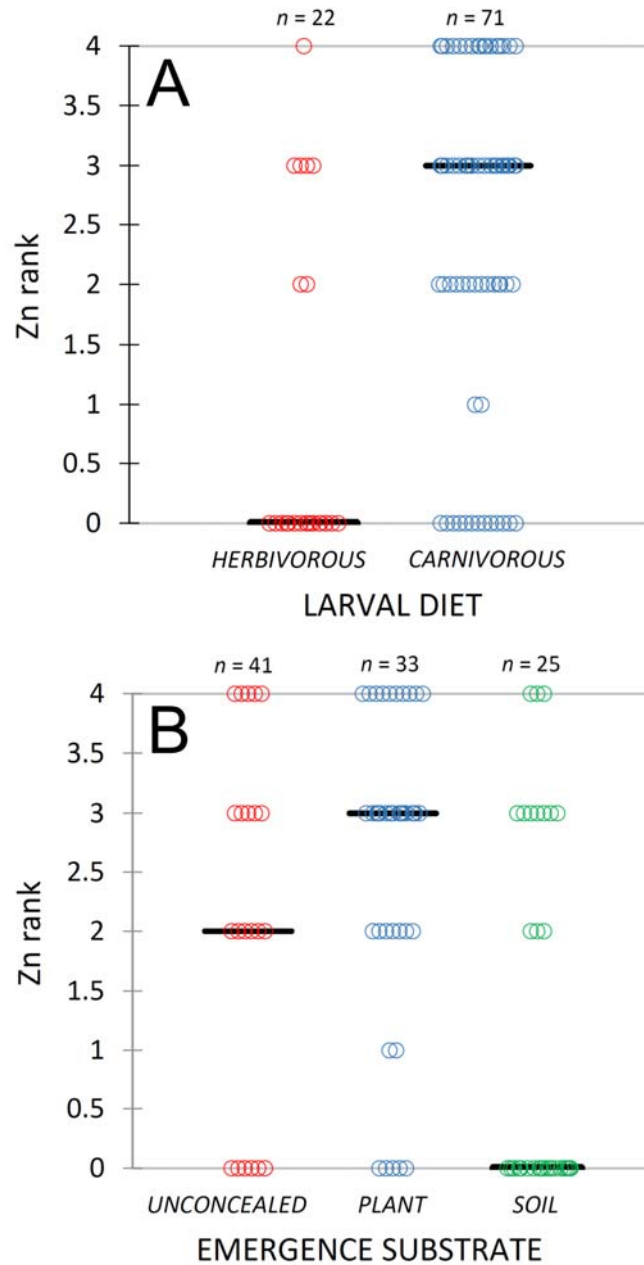


Figure 5.2.5. Dispersion plot showing the distribution of Zn % (ranked) in the species falling into the key life-history categories considered. The horizontal black lines indicate the median values. Sample size (number of species) is specified on the top.

5.2.6. Discussion

Mandibles of insects are complex organs that are used for a variety of functions. Because they are also use to manipulate food and to cut or break the emerging substrate after adult development to allow young individuals to exit from their development site, we hypothesized that the type of food and/or the type of emerging substrate may play a role in determining the enrichment by metals (Zn in our study).

The mandibles of those species that pupate within a hard substrate, e.g. in wood, are very important for the successful egress of the newly eclosed individuals, and morphological studies show that mandible shape is adapted for this function. For example, some wasps laying eggs in wood have mandibles are often very robust with chisel-like cutting teeth (Quicke, 1997). Similarly, Camargo *et al.* (2015) found morphological differences among mandibles of grass-cutting ant species (which have generally shorter and massive mandibles, generally with two teeth) and leaf-cutting ant species (which have generally larger and more elongated mandibles, with numerous teeth), supporting the hypothesis that morphological differences relate with resource use. Across Polistinae (Vespoidea: Vespidae), the genera *Agelaia* and *Angiopolybia* possess robust mesial mandibular structures that may be associated with necrophagy, while in some epiponine genera, poorly developed mesial denticles and strong torsion of mandibles may be partially associated with the use of wood fibers for nest construction (Silveira & Santos, 2011). Across *Osmia* bees (Apoidea: Megachilidae) Williams and Goodell (2000) found greater similarity among bees that use leaf material for nest construction than among the species with use mud for nest construction, with a broad proximate bite surface characterizing leaf-using species. Thus, mandibles of leaf-using species may vary less because of selection on shape, or because of functional constraints for shearing and macerating leaf; these constraints are obviously absent in mud-using species. Furthermore, within apoid wasps (Apoidea:

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

Sphecidae and Crabronidae), it is long-term known that ground-nesting species have more robust and enlarged mandibles than cavity-nesting species, since the latter colonize already excavated tunnels in wood and do not have to dig to construct the nest (Bohart & Menke, 1976).

Less clear is if the adaptive morphology of mandibles to manipulate hard-material food and emerging site also include the incorporation of metals into their cuticular structural matrix. Indeed, metals such as Zn and Mn are associated with phenolic material and are involved in cuticular hardening in insects (Hillerton *et al.*, 1982; Hillerton & Vincent, 1982; Edwards *et al.*, 1993). Hillerton & Vincent (1982) found no metal in the most primitive insect orders, with zinc appearing in the more recent exopterygotes.

Possible association between metal occurrence and resource used was advanced in the past for some insect lineages. For example, the presence of Zn or Mn in mandibles of some herbivorous insects reduce the abrasive wear that mandibles suffer through chewing hard, often silica-rich, plant materials (Hillerton & Vincent, 1982; Hillerton *et al.*, 1984; Edwards *et al.*, 1993). As a matter of fact, Hillerton & Vincent (1982) reported Mn and Zn occurring only in the mandibles of herbivorous insects and in ants. Zn and Mn enrichment have been found in the mandibles of species of Formicidae which range widely in both nesting behaviour, habitat and food resource use (Hillerton & Vincent, 1982; Shofield, 2001). On the other hand, the ability to moisten wood predicts the presence of Zn in termites lineages (Cribb *et al.*, 2008b). The adaptive role of Zn in mandibles is also suggested by the fact that Zn enrichment occurred in localized areas, typically on the cutting edges or teeth of the mandibles. In any case, despite behavioural correlates with Zn enrichment (e.g association with herbivory) have been suggested, it is still difficult to evolutionarily build a trend of metal

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

occurrence, given the expanding catalogue of enriched organisms and structures (Schofield, 2001).

Within Hymenoptera, a clear trend is not clear. For example, within a large sample of species in the Cynipoidea, we previously found Zn in the mandibles of all species, despite the important variation in emerging site, which ranges from hard galls for gall-wasps and their inquiline wasps (Cynipidae) to simply the host cuticle in case of parasitoids attacking unconcealed hosts (many Figitidae) (Polidori *et al.*, 2013). Not even the level of Zn enrichment changes with substrate hardness in mandibles across Cynipoidea (Polidori *et al.*, 2013).

Concerning Hymenoptera as a whole, Quicke *et al.* (1998) showed that the cutting edge of the mandibles of many hymenopterans that chew hard substrates during emergence almost invariably contain high concentrations of Zn, and the occurrence itself of Zn was extremely widespread in the sample analysed by these authors. In fact, they found Zn to lack only in two aculeate wasps, two symphytan wasps, and only one member of Parasitica (Proctotrupoidea). By looking at the superfamily-level phylogeny of Hymenoptera known at the time of their study, Quicke *et al.* (1998) thus suggest that Zn-enrichment appeared once in Symphyta, when the so-called Unicalcarida separated from the rest of the group, and then was conserved, in Apocrita, across all groups with only two exceptions: Pelecinidae (Proctotrupoidea) and Vespidae (Vespoidea) (both considered as reversals).

We confirm that most Hymenoptera have Zn in their mandibles, though our enlarge sample showed that this trait is possibly less widespread than as suggested by previous studies on these insects. As in Quicke *et al.* (1998) the use of metal for cuticular hardening in mandibles does not seem ancestral to the order. Zn lacks in the three more basal groups of “Symphyta”, and it appears first in the Siricoidea, i.e. in correspondence of a transition to an endoxylous larval habit. The occurrence of Zn is

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

then invariably conserved until it seemed to be lost in the family Agaonidae (fig wasps), the only family in Chalcidoidea lacking Zn in the mandibles. It is very difficult to hypothesize why fig wasps do not have Zn; adults emerge from fig fruits, so from a relatively soft substrate, but there are many other groups of Chalcidoidea emerging from apparently soft tissues, such as cuticle of unconcealed host pupae or larvae (Heraty *et al.*, 2013). The fact that many parasitoids attacking unconcealed hosts possess Zn is not in accordance with our hypothesis that concealment needs metal incorporation during egression. Indeed, plants and unconcealed emerging sites were both associated with great Zn rank.

Zn seems also to be lost twice in Proctotrupeoidea (in Pelecinidae and in Proctotrupidae). This is also difficult to explain, particularly for Pelecinidae, which are parasitoids of beetle larvae developing into soils. It is true that, except for the apex of its abdomen, pelecinid wasps pupate external to the host remains (without any cocoon), but they should in any case dig through soil to emerge. However, this result is in line with the fact that we did not find a greater probability to have Zn in species emerging from soils. Indeed, all ground-nesting bees and wasps also lack Zn. From this point of view, our hypothesis that excavate through soils would require Zn enrichment seems to be not valid. In the “Terebrantia” groups basal to the Aculeata (Evanioidea, Stephanoidea, Trygonaloidea), Zn seems to be universally present, and this trait seems to be conserved at least at the beginning of Aculeata radiation. Indeed, Chrysidoidea (the basal group of stinging Hymenoptera) possess Zn.

However, Zn becomes extremely rare in the mandibles of all the other derived aculeate groups, lacking in all families except in Mutillidae, Sapygidae, Formicidae and Ampulicidae, the latter (basal to all the other Apoidea) being the only apoid family to have this trait. The presence of Zn in Chrysidoidea, Mutillidae and Sapygidae may be related with the fact they are all parasitoids of concealed hosts (mostly other aculeate

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

Hymenoptera) (O'Neill, 2001; Poldori *et al.*, 2010a, 2010b). However, again, this explanation did not find much support, since both these parasitoids and their hosts emerge from the same substrates, and hosts invariably lack Zn. On the other hand, at least for Chrysoidea and Mutillidae attacking apoid wasps, the adults of parasitoids either lay eggs on or into host larvae or pupae, while the hosts lay eggs on paralyzed prey. Some chrysidids even lay eggs on host stored prey, so it is difficult to explain why they have Zn and their hosts not, developing both in the same site and using the same food resource at larval stage. Also surprisingly is that the mandibles of vespids do not contain any metals: females both chew prey insects and crawl into wood or cut leaves to extract material for nest construction (Hunt, 2007), so an association would have been expected. Indeed, other leaf-cutting hymenopterans, such as ants, indeed do possess Zn in their mandibles, with these harder mandibles would be energetically more efficient because the cutting edges would deform less during cutting and because they would be less susceptible to dulling wear (Schofield *et al.*, 2002).

Similarly to the apparently absent role of emerging site, whose characteristics do not seem to have affected the evolution of Zn enrichment in Hymenoptera mandibles, the other considered life-history trait, related to food type at the larval stage, do not seem to predict the occurrence and level of Zn. Indeed, although we found a significant association between Zn rank and larval diet (species with herbivorous larvae less prone to have Zn than those with carnivorous larvae), all gall-wasps have Zn, and all predatory wasps lack Zn. Furthermore, our results disagree with the hypothesis that since parasitoid wasp larvae consume only their hosts, Zn may be acquired from host tissues. In fact, again, gall-wasps, which only feed on plant tissues (Nieves-Aldrey, 2001), have all Zn. On the other hand, food-stealing (kleptoparasitic) chrysidid wasps and their hosts feed on the same resources at the larval stage, and only the former have Zn. This implies that it is unlikely that a diet deficient or rich in Zn determine their

Capítulo II: Incorporación de cinc en las mandíbulas

incorporation in the mandibles of adults. One possibility is that the physiological ability to drive metals acquired from the food to the adult mandibles is phylogeny-dependent. In fact, at the moment and with our data sample, maybe the best explanation for the occurrence of Zn in the mandibles is the phylogenetic history. This contrasts with studies more clearly reporting metals presence and level in the ovipositor of Hymenoptera as a result of adaptation to drilling hard oviposition substrates (Quicke *et al.* 1998; Quicke *et al.* 2004; Polidori *et al.*, 2013).

On the other hand, the few cases of reversal from Zn presence to absence may suggest that other life-history traits – here not investigated – may actually have played a role in shaping mandible structure of Hymenoptera. New studies are thus necessary to clarify the evolution of this trait in this insect order.

Capítulo III

Pheomelanin in the secondary sexual characters of male parasitoid wasps (Hymenoptera: Pteromalidae)

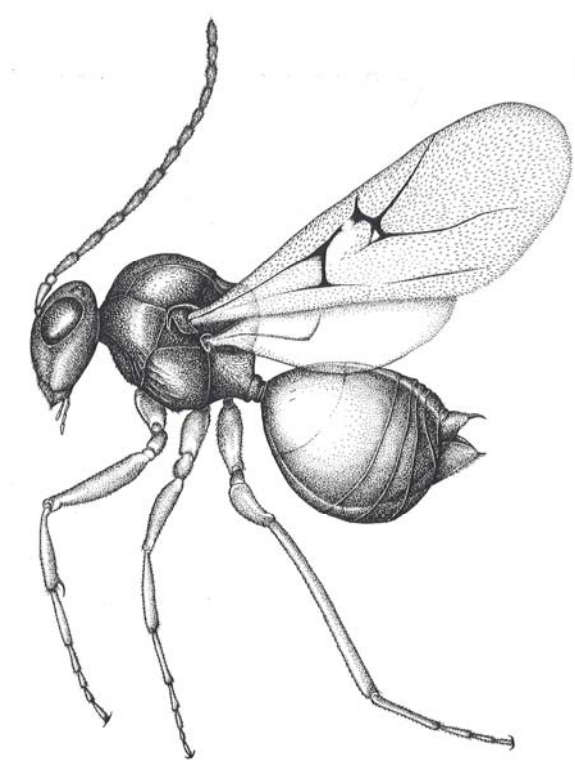
"El cuerpo del animal evoluciona no solo como respuesta a presiones externas del medio, sino también para adaptarse a las preferencias sexuales del sexo opuesto".

Lynn Margulis



5.3.1. Resumen

La distribución de eumelanina y feomelanina, los pigmentos biológicos más prevalentes, se han investigado poco en insectos. Las porciones del cuerpo desde amarillentas a parduzcas, que en muchos vertebrados se asocian con feomelanina, son visibles en muchos insectos, pero su naturaleza química rara vez se ha examinado con un detalle similar. Al utilizar la espectroscopía Raman, encontramos eumelanina y feomelanina en diferentes partes del cuerpo de los machos de avispas parasitoides del género *Mesopolobus* (Hymenoptera: Pteromalidae), que poseen manchas y rayas específicas en patas y/o antenas (caracteres sexuales secundarios). Encontramos una fuerte señal de eumelanina en la clava antenal de todas las especies estudiadas de *Mesopolobus* y en la mancha negra circular y la proyección triangular negra en el ángulo apical externo de la tibia media de *M. tibialis* y *M. xanthocerus*. La eumelanina también fue predominante en el tórax negro de *Mesopolobus* y otros miembros de la familia. La feomelanina, por otro lado, se detectó como predominante únicamente en ciertas partes del cuerpo de *M. tibialis* y *M. xanthocerus*, precisamente en una franja marrón muy estrecha en el fémur medio y, solo en *M. tibialis*, en un óvalo/franja longitudinal en la tibia media. Los dos tipos de melanina coexisten en la mayoría de las áreas pigmentadas, sin embargo, uno es claramente predominante en relación con el otro, de acuerdo con la variación de la intensidad de la señal Raman de los picos. Una franja tibial naranja amarillenta adicional presente en *Mesopolobus* no incluye melaninas. La feomelanina podría estar entonces más presente en insectos de lo que se suponía. Se puede además sugerir una evolución convergente de ornamentos sexuales masculinos basados en melaninas entre vertebrados (por ejemplo, plumas de aves) y avispas.



Publicación

Habitus Barbotinia oraniensis (Barbotín 1964)

**Pheomelanin in the secondary sexual characters of male
parasitoid wasps (Hymenoptera: Pteromalidae)**

Alberto Jorge¹, Carlo Polidori², José Luis Nieves-Aldrey³

¹Laboratorio de Microscopía, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, E-28006, Madrid, Spain

²Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Avenida Carlos III, s/n, E-45071 Toledo, Spain

³Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, E-28006, Madrid, Spain

La versión publicada de este artículo se encuentra en la revista *Arthropod Structure & Development* (45: 311-319, DOI: 10.1016/j.asd.2016.05.001).

5.3.2. Abstract

The occurrence and distribution of eumelanin and pheomelanin, the most prevalent biological pigments, has been rarely investigated in insects. Particularly yellowish to brownish body parts, which in many vertebrates are associated with pheomelanin, are visible in many insects but their chemical nature was rarely examined to a similar detail. Here, by using Dispersive Raman spectroscopy analysis, we found both eumelanin and pheomelanin in different body parts of male parasitoid wasps of three species of the genus *Mesopolobus* (Hymenoptera: Pteromalidae), which are known to have species-specific spots and coloured stripes on the legs and/or antennae which are displayed to females during courtship. We found a strong eumelanin signal in the antennal clava of all studied *Mesopolobus* species and in the circular black spot or callosity and the triangular black projection on the outer apical angle of the typically expanded middle tibia of *M. tibialis* and *M. xanthocerus*. Eumelanin was also the predominant pigment in the black thorax of *Mesopolobus* and other members of the family. Pheomelanin, on the other hand, was detected as predominant only in certain body parts of *M. tibialis* and *M. xanthocerus*, precisely in a very narrow, longitudinal brownish stripe on the mid femur and, only in *M. tibialis*, in a brownish oval-longitudinal stripe on the middle tibia. The two melanin types co-occurred in most pigmented areas, but more often one is clearly predominant relative to the other, according to the variation of Raman signal intensity of their signature peaks. A further tibial yellowish-orange stripe present in both these species did not include melanins of any type. Pheomelanin, could be more widespread than previously known in insects. A convergent evolution of melanin-based male sexual ornaments between vertebrates (e.g. bird feathers) and wasps can be suggested, opening to a new line of comparative evolutionary studies.

Keywords: eumelanin, pheomelanin, *Mesopolobus*, secondary sexual character, pigmentation.

5.3.3. Introduction

Insect pigmentation, derived from the synthesis of pigments and/or pigment precursors in the epidermal cells, is a highly variable trait, greatly variable among species and among individuals within species, as well as across different life-stages (Majerus, 1998; Wittkopp & Beldade, 2009). The most prevalent biological pigments, in insects as in the majority of living organisms (Riley, 1997; Nosanchuk & Casadevall, 2006; Gao & García-Pichel, 2011; Eisenman & Casadevall, 2012; Eliason *et al.*, 2013), are melanins, which are heterogeneous polymers derived by the oxidation of phenols and subsequent polymerization of intermediate phenols and their resulting quinones (Ito *et al.*, 2011).

Two melanin forms exist in nature: eumelanin (i.e. polymer of indole units) and pheomenalin (i.e. oligomer of sulfur-containing heterocycles) (Riddle, 1909; Simon & Peles, 2010; García-Borrón *et al.*, 2011). Both types are synthesized from the amino acid *L*-tyrosine with the participation of tyrosinase, the key enzyme of melanogenesis in animals (Ito *et al.*, 2011; García-Borrón *et al.*, 2011). Abundant eumelanin leads to grey to black colouration, while when pheomenalin is the predominant pigment, yellowish to brownish colouration occurs (García-Borrón *et al.*, 2011).

Traditionally, and in absence of detailed analyses, dark pigmentation in insects was simply defined as due to melanin; in a number of cases this pigment was characterized as eumelanin (Needham, 1978; Kohler *et al.*, 2007; Lindstedt *et al.*, 2010; Shamim *et al.*, 2014). On the other side, it has been believed for a long time that pheomelanin is specific of vertebrates, particularly mammals and birds, and with more recent evidence reptiles and amphibians (Ito & Wakamatsu, 2003; Roulin *et al.*, 2013;

Wolnicka-Glubisz *et al.*, 2012). Indeed, pheomelanin seems to be very rare in invertebrates, with only one case reported in molluscs (Speiser *et al.*, 2014) and only one in insects, with pheomelanin occurring exclusively in the brownish-reddish individuals of a grasshopper species (Galván *et al.*, 2015a). Unpublished data on a butterfly species also point to pheomelanin in the wings (K. Wakamatsu, S. Ito and P.B. Koch, pers. comm. cited in Galván *et al.* (2015a)).

Melanins have primarily evolved to protect cells from the damaging effects of ultraviolet (UV) radiation (Brenner & Audiencia, 2008; Gao & Garcia-Pichel, 2011) and are involved in additional physiological processes such as thermoregulation, photo-protection, immune response, cuticle hardening and desiccation resistance (Cerenius & Söderhäll, 2004; Nappi & Christensen, 2005; Dubovskiy *et al.*, 2013; Rózanowska *et al.*, 1999; Riley, 1997; Ramniwas *et al.*, 2013). However, their optical properties make that they fulfil secondary functions related to visual communication (Searcy & Nowicki, 2005), including intra-specific recognition, mate choice, mimicry and aposematism (Price *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2000; Galván & Møller, 2013).

Inter-sexual communication based on pigment-based visual signals is particularly known in mate choice dynamics of both vertebrates and invertebrates (Andersson, 1994). Indeed, males and females are often distinguished by secondary sexual characteristics encrypted in pigmentation patterns, some of which have evolved through sexual selection (Darwin, 1871). In particular, inter-sexual selection (i.e. females chooses males) rises to various “ornaments” consisting in exaggerated morphological features, and pigments play a major role in such a visual communication channel (Jawor & Breitwisch, 2003; Roulin, 2004).

Interestingly, while both eumelanin and pheomelanin are well known to be involved in pigmented sexual characters of male vertebrates (e.g. Jawor & Breitwisch, 2003; McGraw, 2008; Guindre-Parker & Love, 2014; Galván *et al.*, 2015b), as far as we

know very little information is available on which type of melanin constitutes the pigmented sexual characters of male invertebrates. For example, while in mature males of the damselfly *Calopteryx japonica* Selys the darkly coloured wing membranes were seen to actually contain eumelanin (Stavenga *et al.*, 2012), in many other cases, including the well-studied model *Drosophila* and one species of ants, pigmented areas in males are still generally referred as based on melanin (Wittkopp *et al.*, 2003; Yeh *et al.*, 2006; Miyazaki *et al.*, 2014), with no further specification. Particularly pheomelanin was never described from secondary sexual characters in invertebrates. Characterizing the chemical nature of pigments involved in secondary sexual characters is indeed important, since it could help reconstructing the evolution of pigment use in relation to their costs and benefits, and to evidence possible differences in species with varying biologies or evolutionary histories (McGraw *et al.*, 2005; Nadeau *et al.*, 2007; Svensson & Waller, 2013).

The Pteromalidae (Hymenoptera) is a large family of parasitoid wasps including about 3500 species in almost 600 genera (Noyes, 2003; Aguiar *et al.*, 2013). Though koinobiont and endoparasitoid species occur in the family, most species are idiobionts and develop as ectoparasitoids of larvae and pupae of at least four orders of insects, including other Hymenoptera (Graham, 1969; Gauld & Bolton, 1988).

Male pteromalids are since long time known to display a wide range of secondary sexual characters, including various colour displays, especially on legs and antennae (Askew, 1971; Graham, 1969; Mitroiu, 2010). Inter-sexual selection seems important in this wasp family, compared with intra-sexual selection (Mitroiu, 2010). Particularly in males of certain species of *Mesopolobus*, a diverse genus distributed across Holarctic, Ethiopic, Oriental and Neotropical regions (Rosen, 1958), the middle tibiae are much wider than normal, with a species-specific combination of brown stripes, orange-reddish stripes and black spots in the outer apical part of tibiae of

middle legs (Askew, 1961; van den Assem, 1974). In addition, the variably enlarged antennal clava may also be black-pigmented (Askew, 1961). The same body parts are not pigmented in females (Askew, 1961; van den Assem, 1974).

During courtship, males of these wasps clearly orient the mid legs in such a way that the pigmented spots and stripes locate just laterally of the female' eyes, and legs are then moved to and from slightly (Askew, 1971; van den Assem, 1974), suggesting a possible function in female choice (Godfray, 1994). In addition, vibrating movements are performed by the antennae, which also present pigmented spots in certain species, in front of females' eyes (van den Assem, 1974). Other pteromalids lack clearly pigmented areas on legs and antennae, while possessing black areas in other parts of the body not involved in courtship (e.g. thorax).

Here, by characterizing the types of melanin present in pigmented body parts of four species of Pteromalidae, we provide evidence of pheomelanin as responsible of wasp pigmentation and the first evidence that this type of melanin is predominant in certain male secondary sexual characters, with eumelanin occurring both in secondary sexual characters and in other body parts.

5.3.4. Materials and methods

In this study, males of five species of Pteromalidae were selected: *Mesopolobus tibialis* (Westwood), *Mesopolobus xanthocerus* (Thomson), *Mesopolobus mediterraneus* (Mayr), *Cecidostiba fungosa* (Geoffroy) (all Pteromalinae) and *Ormocerus latus* Walker (Ormocerinae). All of them are ectoparasitoids of other Hymenoptera, namely gall-wasps (Cynipidae), i.e. they oviposit into galls produced by cynipid wasps on plants, allowing larvae to develop at the expense of the host wasp larvae (Askew *et al.*, 2013). All individuals were collected while emerging from oak (*Quercus*) or chestnut

Capítulo III: Feomelanina en Pteromalidae

(*Castanea*) galls in Spain, the host galls belonging to gall-wasps of the genera *Andricus* and *Dryocosmus* (Table 5.3.1).

Table 5.3.1. Details of the data collecting of male parasitoids used in this study.

Pteromalid species	Host galls of the sample	Year and site of the sample
<i>Mesopolobus tibialis</i> (Westwood)	<i>Dryocosmus kuriphilus</i> Yasumatsu on <i>Castanea sativa</i> Mill.	2015, San Roque de Riomiera (Cantabria, Spain)
<i>Mesopolobus xanthocerus</i> (Thomson)	<i>Andricus burgundus</i> Giraud on <i>Quercus suber</i> L.; <i>Andricus quercusramuli</i> (L.) on <i>Quercus faginea</i> Lam.	2015, Valdeazores (Ciudad Real, Spain); 2006, Arganda del Rey (Madrid, Spain)
<i>Mesopolobus mediterraneus</i> (Mayr)	<i>Andricus grossulariae</i> Giraud on <i>Quercus suber</i> L.	2015, La Cigueñuela (Ciudad Real, Spain)
<i>Cecidostiba fungosa</i> (Geoffroy)	<i>Andricus quercusradicis</i> (Fabr.) on <i>Quercus pyrenaica</i> Willd.	1983, Casa de Campo (Madrid, Spain)
<i>Ormocerus latus</i> Walker	<i>Andricus grossulariae</i> Giraud on <i>Quercus suber</i> L.	1990, Puerto Despeñaperros (Ciudad Real, Spain)

Dispersive Raman spectroscopy is a useful non-destructive technique to analyse melanins (Galván et al., 2013; Galván & Jorge, 2015), which are known to be difficult to detect due to their low solubility (Gonçalves et al., 2012). The spectra resulting from Raman analysis are commonly used as footprints to identify molecules (Colthub et al., 1990; Czamara et al., 2015), so that comparisons with published spectra and databases make relatively easy the detection of a given molecule in a new

sample (Galván & Jorge, 2015). We used Raman spectroscopy to detect melanins in the cuticle of the studied insect species.

On the whole, 18 males were analysed, 2-6 individuals per species. We checked for the occurrence of eumelanin and pheomelanin, for all species, in the black dorsal area of the thorax, the middle tibia (in correspondence with the different pigmented spots or stripes, or in the same locations in species lacking pigmentation), in the middle femur (in correspondence with the brown stripes or in the same location in species lacking pigmentation) and in the antennal clava (in correspondence with the black area).

We used a Thermo Fisher DXR confocal dispersive Raman microscope (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) operating in the Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN-CSIC, Madrid, Spain) with a point-and-shoot Raman capability of 1- μm spatial resolution and using an excitation laser source at 780 nm of 1-3 mW power for eumelanin pigment and 10 mW power for pheomelanin. The single spectra were obtained using a 50x confocal objective, a slit aperture of 25 μm and a grating of 400 lines/mm. These conditions produced an average spectral resolution of 2.2–4.4 cm^{-1} in the wavenumber range of 150-2500 cm^{-1} . An integration time of 3-5 s x 12 accumulations allowed getting an acceptable SNR (Signal to Noise Ratio). The system was operated with Thermo Fisher OMNIC 8.1 software. Calibration and aligning of the spectrograph were checked using pure polystyrene. For each individual, each analysis (i.e. at each studied body part and pigmented area) was repeated 3-6 times. The spectra were either associated with eumelanin or pheomelanin by visual comparisons of the relevant peaks known for these pigments, as retrieved by recent literature and reference database (e.g. Galván *et al.*, 2015a; Galván & Jorge, 2015; Huang, 2004; De Gelder *et al.*, 2007).

To explore the dissimilarities among the analysed areas and species (i.e. pigmented and not pigmented body parts for all species) based on Raman spectra, we performed an Agglomerative Hierarchical Clustering (AHC) (Gordon, 1999). This method found relatively homogeneous clusters of cases based on Raman peak values (mean values across individuals), and it was performed through Ward's method based on Euclidean distance (dissimilarity) between pairs of objects. Since the actual values of the spectrum peaks are affected by the intensity signal, the raw peak values (p) for the 150-2500 range of Raman shift (cm^{-1}) were transformed as $(p/\Sigma(p))\times 100$ before the data analysis, to make the spectra comparable between samples. The cluster analysis was carried out in the software XStat 2012 (Addinsoft).

To improve the main peaks identification, the Raman spectra were analysed by a Reference Deconvolution Method (Middendorf, 1974). This method circumvents distortions affecting all the spectral peaks in the same way by using a well-known reference signal with identical lineshape distortions (Morris *et al.*, 1997). An ideal lineshape is then obtained, once the lineshape distortion was removed, by reconvoluting the spectrum with a Lorentzian lineshape, obtaining an ideal lineshape (Middendorf, 1974).

5.3.5. Results

The three species of Pteromalidae belonging to the genus *Mesopolobus* have their males varying in their pigmented areas (Fig. 5.3.1). *Mesopolobus tibialis* (Fig. 5.3.1A-B) possess a black antennal clava, a brown stripe along the middle of the mid tibiae, a bright red/orange stripe near the interior edge of the mid tibiae, and a conspicuous black spot in the mid tibiae just on the outer apical part of the tibia above the tarsal articulation; furthermore, this species presents a lighter brown stripe in the mid femur. *Mesopolobus xanthocerus* (Fig. 5.3.1C-D) also possess the black antennal clava, a

black triangular projection instead of the black spot, and the bright red/orange stripe in the middle tibia, a very light brown stripe in the femur, but lacks the tibial brown stripe. *Mesopolobus mediterraneus* (Fig. 5.3.1E-F) does not show any spot or stripe on the leg, but have an enlarged, conspicuous black clava on the antennae. The other two studied species, *Cecidostiba fungosa* and *Ormocerus latus*, lack any pigmented areas in legs and antennae.

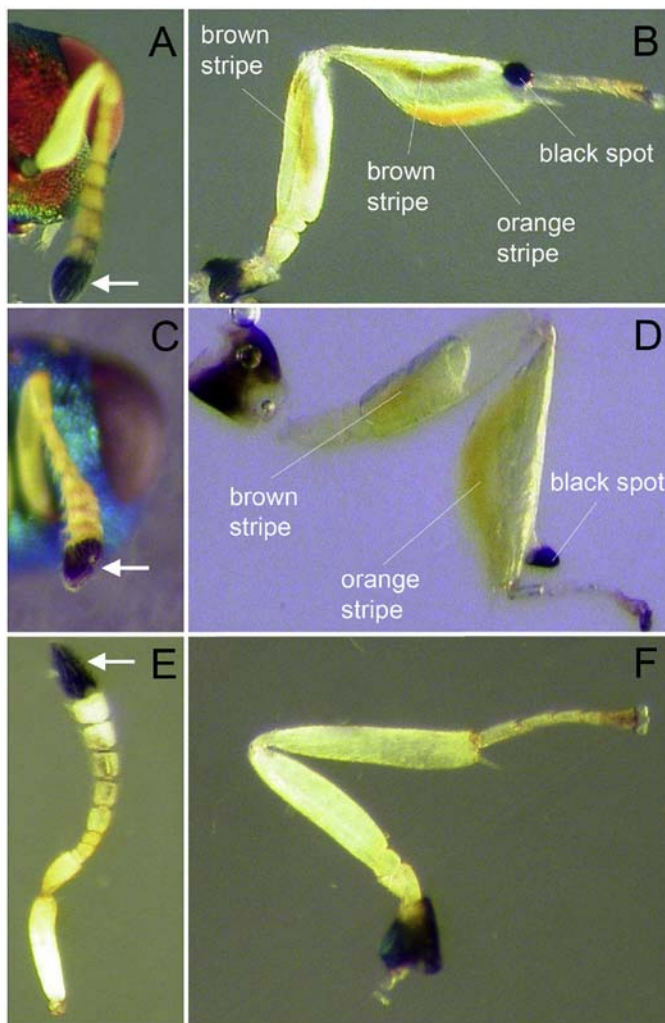


Figure 5.3.1. Overview of pigmented body parts in the three studied *Mesopolobus* species. A, antenna of *M. tibialis* (arrow points to the black clava); B, middle leg of *M. tibialis* showing black spots, brown stripes and orange stripes in tibia and femur; C, antenna of *M. xanthocerus* (arrow points to the black clava); D, middle leg of *M. xanthocerus* showing black triangular projection, brown stripes and orange stripes in tibia and femur; E, antenna of *M. mediterraneus* (arrow points to the black clava); F, the middle leg of *M. mediterraneus* lacking pigmented parts in either tibia or femur.

All the five species, however, have a thorax clearly pigmented in black when observed in dark field condition of the microscope (which eliminates the effect of the

light), though its colour appears green to blue metallic under light incidence (Fig. 5.3.2A).

The inspection of Raman spectra revealed both eumelanin and pheomelanin variably occurring in the analysed pigmented area of the studied species.

In all five species, the black colouration of the thorax (Fig. 5.3.2A) can be clearly associated with abundant eumelanin (Fig. 5.3.2A), and the same pigment was abundant also in the black spots on the middle tibia of both *M. tibialis* and *M. xanthocerus* (Fig. 5.3.2B) and in the antennal clava of all *Mesopolobus* (Fig. 5.3.2C).

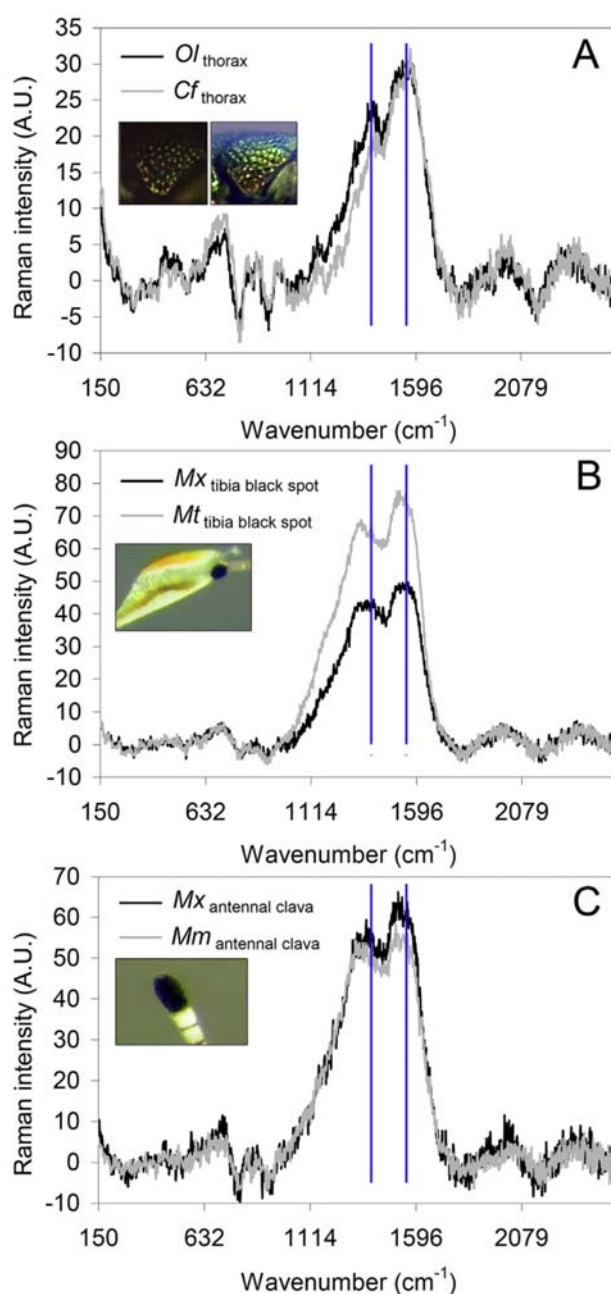


Figure 5.3.2. Examples of Raman spectra of eumelanin-based pigmented body parts of pteromalid wasps. A, the black thorax of *Ormocerus latus* and *Cecidostiba fungosa* (note the thorax photographed under dark (left) and bright (right) conditions); B, the black spots on the tibia of *Mesopolobus xanthocerus* and *M. tibialis*; C, the black antennal clava of *M. xanthocerus* and *M. mediterraneus*. The vertical blue lines indicate the typical peaks for the Raman spectrum of eumelanin ($\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ and 1580 cm^{-1}). Only the signature (lines at peaks) for the predominant pigment is shown. Species abbreviations: *Ol*: *O. latus*, *Cf*: *C. fungosa*, *Mx*: *M. xanthocerus*, *Mt*: *M. tibialis*, *Mm*: *M. mediterraneus*.

Indeed, the Raman spectra revealed a strong signal of eumelanin, with its typical signature showing two main bands (Fig. 5.3.2), well highlighted through the Reference Deconvolution Method (Fig. 5.3.S2A), one at about 1385 cm^{-1} and the other, even more intense, at about 1580 cm^{-1} . Both peaks are clearly associated with the spectrum of synthetic eumelanin (Kim *et al.*, 2015), and also corresponded to those known for eumelanin in other organisms (Huang *et al.*, 2004; Perna *et al.*, 2013). These peaks were associated with the vibration of stretching of the hexagonal carbon rings in the molecule structure and with the vibration of three of the six C-C bonds within the rings and with the vibration of the C-H of methyl and methylene groups in the eumelanin polymers (Huang, 2004).

The deconvolution method also made appreciable two further peaks, at 1496 cm^{-1} and 2000 cm^{-1} , which are known to characterize the signature of pheomelanin. These peaks were found associated with synthetic pheomelanin spectrum (Kim *et al.*, 2015) as well as with pheomelanin spectra in other organisms (Galván *et al.*, 2015a), and they have been assigned, respectively, by the out-of-plane deformation and the stretching vibration of the phenyl rings in the molecule structure, and to overtone or combination bands (Galván *et al.*, 2013). However, this pigment did not seem prevalent here, particularly when looking from the very low abundance of the 2000 cm^{-1} .

Other peaks, such as those at 1151 cm^{-1} , 1262 cm^{-1} and 1327 cm^{-1} (Fig. 5.3.2, Fig. 5.3.S2A) were previously associated with the vibrational modes of chitin, the fundamental polysaccharide composing the insect cuticle (De Gelder *et al.*, 2007), while two small peaks at 460 cm^{-1} and 689 cm^{-1} are characteristic of the N-Acetyl-D-Glucosamine (De Gelder *et al.*, 2007), the structural monomer of chitin (Jamialahmadi *et al.*, 2011) (Fig. 5.3.2, Fig. 5.3.S2A).

Clear eumelanin signature (peaks at 1385 cm^{-1} and 1580 cm^{-1}) was also found in the brown stripes on the middle tibia of *M. tibialis*, but in this case this pigment was found to be intermixed with pheomelanin, since also the characteristic peaks for this pigment (1490 cm^{-1} , 2000 cm^{-1}) were clearly appreciable (Fig. 5.3.3A). Further peaks (e.g. 1262 cm^{-1}) (Fig. 5.3.3A) can again be associated with chitin (Fig. 5.3.S2B).

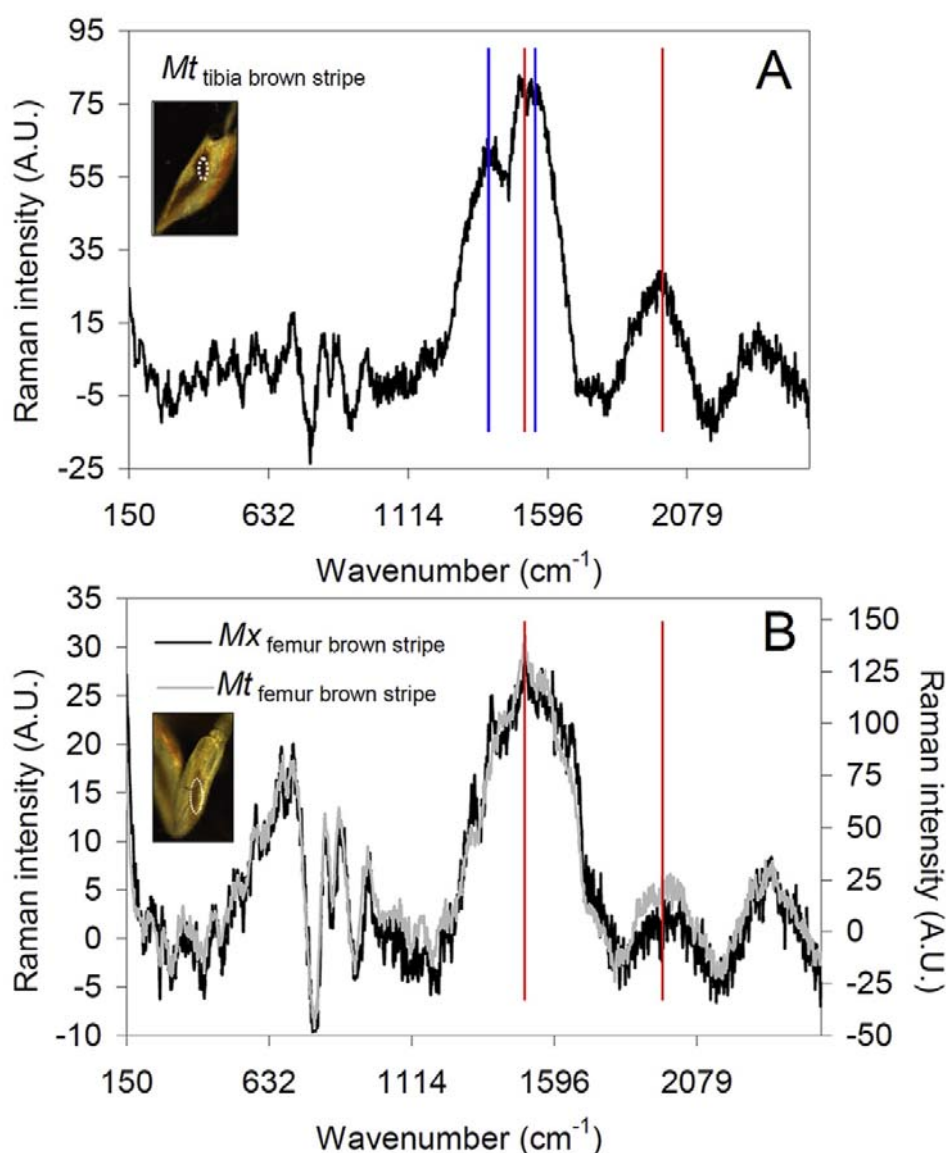


Figure 5.3.3. Examples of Raman spectra of mixed (eumelanin + pheomelanin) and pheomelanin-based pigmented body parts of *Mesopolobus*. A, the tibia brown stripe of *M. tibialis*, which includes both types of melanin; B, the femur brown stripe of *M. xanthocerus* and *M. tibialis*, which includes only pheomelanin. The vertical blue lines indicate the typical peaks for the Raman spectrum of eumelanin, while the vertical red lines indicate the typical peaks for the Raman spectrum of pheomelanin ($\sim 1490\text{ cm}^{-1}$ and 2000 cm^{-1}). Only the signatures (lines at peaks) for the predominant pigments are shown. Note in B that the signal intensity was very different for the two species so that two Y-axes were used in the graph to make the spectra more easily comparable. Species abbreviations: *Mx*: *M. xanthocerus*, *Mt*: *M. tibialis*. 163

Pheomelanin was also observed to be a predominant pigment in the lighter brownish stripe on the middle femur of *M. tibialis* and *M. xanthocerus*, with weaker signal of eumelanin presence (Fig. 5.3.3B, Fig. 5.3.2SB). Indeed, two distinct peaks at 1490 cm^{-1} and 1988 cm^{-1} ($\sim 2000\text{ cm}^{-1}$) represented again the signature of pheomelanin (Fig. 5.3.3B, Fig. 5.3.2SB). Eumelanin peaks are visible, but particularly that at 1385 cm^{-1} was much less intense compared to those of pheomelanin (Fig. 5.3.3B, Fig. 5.3.2SB). Additional chitin-related bands were observed here at 705 cm^{-1} , 1316 cm^{-1} and 1425 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} , and 1936 cm^{-1} (Fig. 5.3.3B, Fig. 5.3.S2B), the latter four again associated with *N-Acetyl-D-Glucosamine*.

As expected, the tibia and femur of *C. fungosa* and *O. latus*, as well as that of *M. mediterraneus*, did not show spectra associable to any type of melanin, in accordance with their pale yellow colour (Fig. 5.3.S1).

At last, the orange/reddish stripe found in the tibia of *M. tibialis* and *M. xanthocerus* apparently did not include either eumelanin or pheomelanin, and the chemical origin of this pigmentation remains unknown at the moment.

The cluster analysis (AHC) based on the Raman spectra peaks reasonably agreed with the presence, and to a lesser extent with the type, of melanin (Fig. 5.3.4).

The first bifurcation strongly separated two large clusters, including either all the melanin-pigmented body parts (thorax, antennal clava, leg stripes and leg spots) or the non-pigmented parts (Fig. 5.3.4). In the second bifurcation of the pigment-based cluster, there was a tendency to further separate the pigmented areas giving a clear pheomelanin Raman signature from the pigmented areas giving a clear eumelanin Raman signature, with the tibial brown stripes of *M. tibialis*, which possibly includes a roughly equal mixture of the two melanin types, closer to eumelanic thoraces (Fig. 5.3.4).

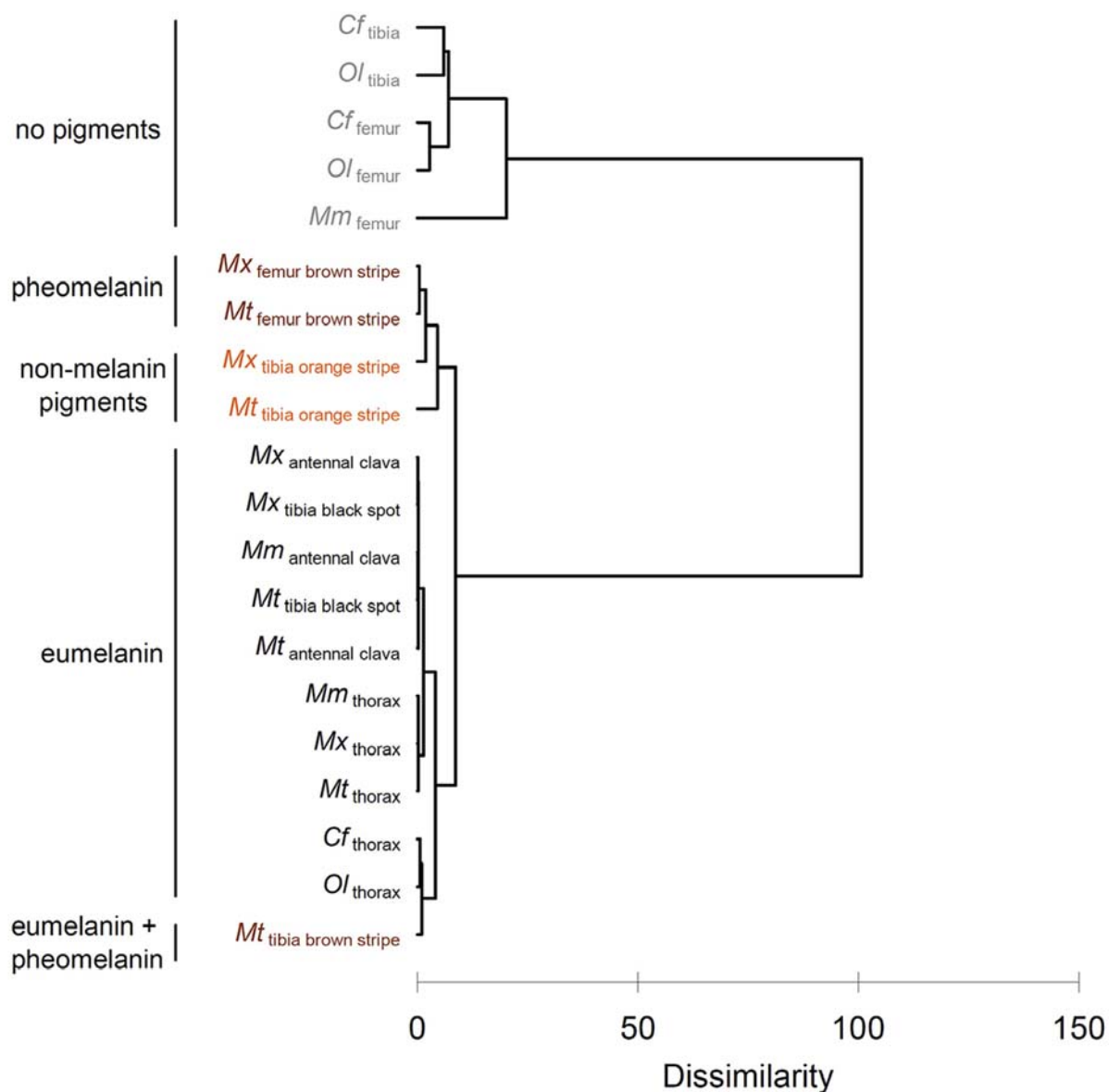


Figure 5.3.4. Dendrogram obtained from the Agglomerative Hierarchical Clustering, based on the mean values of each peak across individuals of each species. Species abbreviations: *Ol*: *O. latus*, *Cf*: *C. fungosa*, *Mx*: *M. xanthocerus*, *Mt*: *M. tibialis*, *Mm*: *M.*

Interestingly, the orange tibial stripes whose spectra did not reveal either eumelanin or pheomelanin were closer to the femur brown stripes, rich in pheomelanin.

5.3.5. Discussion

Eumelanin is already known to occur in insects (Needham, 1978; Lindstedt *et al.*, 2010; Galván *et al.*, 2015a) and we here provide the first clear evidence for its occurrence in Hymenoptera. In other Hymenoptera, such as bumblebees (*Bombus*), both black and red pigments in hair were defined as melanins, with no further distinction between the types of melanin (H. Imlay and H. Hines, unpublished data cited in Rapti *et al.* (2014)). Differently from what was observed in grasshoppers (Galván *et al.*, 2015a), eumelanin spectra in the studied wasps did not present a clear peak at 500 cm^{-1} . This band is due to the out-of-plane deformation and the stretching vibration of the phenyl rings, and it is the same occurring in pure eumelanin, as the one found in *Sepia* ink (Centeno & Shamir, 2008). Thus, it is possible that actually it is not produced by eumelanin polymers, but by some compounds linked with eumelanin. One possibility, supported by recent literature, is that the peak at 500 cm^{-1} is due to eumelanin polymers which have sequestered Fe^{3+} , being these complex cations stable with melanins through the action of ferritin, which presents a residual of tyrosine and thus would explain the vibration of phenyl ring (Zecca *et al.*, 2001).

Eumelanin was also found as the predominant pigment in the thorax, despite its brilliant blue-green iridescent colouration. Iridescent colour in insects is often reported to be structural, i.e. not due to pigments but to the effect of light incidence on a particularly structured cuticle surface (Fox, 1992). Because the thorax is not iridescent when observed in dark field condition and because these wasps have a finely sculptured cuticle, we suggest that pteromalid wasps may also possess structural colouration, as it was found in other wasps (Kroiss *et al.*, 2009). Analysis of the cuticle microstructure is necessary to verify this hypothesis.

More importantly, we provide the second ever evidence that pheomelanin may be responsible of brownish-reddish pigmentation in certain insects, being the previous case reported in grasshoppers (Galván *et al.*, 2015a). Together with unpublished data on its occurrence in a nymphalid butterfly (K. Wakamatsu, S. Ito and P.B. Koch, pers. comm. cited in Galván *et al.* (2015a)), our results suggest that this pigment could be more common in insects than previously believed. The presence of pheomelanin as the predominant pigment in the femur of *M. tibialis* and *M. xanthocerus* is especially interesting if we consider that pheomelanin in nature very rarely constitutes more than 25% of the total melanin present in a pigmented sample (Simon & Peles, 2010).

We have shown that both pheomelanin and eumelanin are responsible for colouration of body parts directed involved in sexual communication during courtship behaviour. Females indeed lack pigmentation in the analysed body parts of males (with the exception of thorax) (Askew, 1971) and behavioural observations reported that *Mesopolobus* males move antennae and legs in a position to make the pigmented stripes and spots visible by females during courtship (van den Assem, 1974). Other species lacking pigmented areas on the legs do not perform such movements, but apparently still vibrate antennae in front of females (van den Assem, 1974). From this point of view, the occurrence of pheomelanin in *M. tibialis* and *M. xanthocerus* is also interesting because of the known large costs associated with its production, compared with eumelanin (Galván *et al.*, 2015b). Indeed, pheomelanin synthesis consumes cysteine and consequently glutathione, an essential defensive molecule against oxidative stress (Napolitano *et al.*, 2004). But such costs may be necessary to increase mating success, since during courtship males would greatly benefit in signalling their quality to females through their pheomelanin-based coloured legs.

Pheomelanin production is also known to be related with environmental conditions, being more rarely detected in animals living in conditions of high oxydative

stress, and in insects this scenario was proposed while explaining pheomelanin occurrence in certain brownish individuals of a grasshopper species (Galván *et al.*, 2015a). Additionally, for melanins in general, populations with a greater degree of melanization live in colder environments (Majerus, 1998; Munjal *et al.*, 1997; Fedorka *et al.*, 2013). However, all of our studied species largely overlap in their distribution and develop and live as adults in very similar environments (galls and gall-wasps habitats), and are often sympatric (Askew, 1971; van den Assem, 1974; Nieves-Aldrey, 1983). Our analysed specimens even come from the same country and from similar development environment (oak or chestnut galls). Thus, the link between pheomelanin production and environmental conditions is unlikely or at least not clear in the case of *Mesopolobus* wasps. On the other side, we also found strong signals of eumelanin in the black thorax of all species analysed here, which could be related with a thermoregulatory function, as it covers the flight muscles that in certain Hymenoptera are used to regulate body temperature (Heinrich, 2004).

Concerning the orange/reddish stripes in the tibia of *M. tibialis* and *M. xanthocerus*, its chemical nature remains unknown, but it seems not to contain melanins. A similar situation was found in a study showing that stick bug egg pigmentation cannot be related with either eumelanin or pheomelanin (Abram *et al.*, 2015). A comparison of our Raman spectra with spectra available for other non-melanic yellow/orange to reddish pigments, such as carotenoids (Merlin J-C, 1985), xanthopterins (Saenko *et al.*, 2013) and ommochromes (Hsiung *et al.*, 2015), all found in insects (Nijhout 1997, Plotkin *et al.*, 2009, Heath *et al.*, 2013), showed also no matches. Thus, colouration in insects in certain cases can be due to still unknown pigments, their characterization being unexplored.

Our study suggests not only that melanins play a role in sexual visual communication in certain parasitoid wasps, but, most importantly, that males of

Capítulo III: Feomelanina en Pteromalidae

different species may have evolved the use of different types of melanins, rather than simply regulate the quantity of one single type, to modulate the colour of the spots and stripes used during courtship. This agrees with the view that cuticle pigmentation can be under sexual selection, thus possibly affecting reproductive isolation and, at an evolutionary scale, speciation (Rundell & Price, 2009).

Although new studies are necessary to formally test evolutionary hypotheses in Hymenoptera, we suggest a possible use of melanins as honest signals, as it occurs in certain birds (Jawor & Breitwisch, 2003; Galván & Møller, 2013; Galván *et al.*, 2015b). A large comparison of species across this insect order supported by a robust phylogeny can shed light in the evolution and significance of melanin pigmentation.

5.3.7. Supporting information

Figure 5.3.S1. Examples of Raman spectra of non-pigmented body parts of pteromalid wasps. A, femur of *O. latus* and *C. fungosa*; B, tibia of *O. latus* and *C. fungosa*; C, femur of *M. mediterraneus*. Species abbreviations: *Ol*: *O. latus*, *Cf*: *C. fungosa*, *Mm*: *M. mediterraneus*. Note the large noise in the signals which indicates that no clear pigment-based peaks are detected.

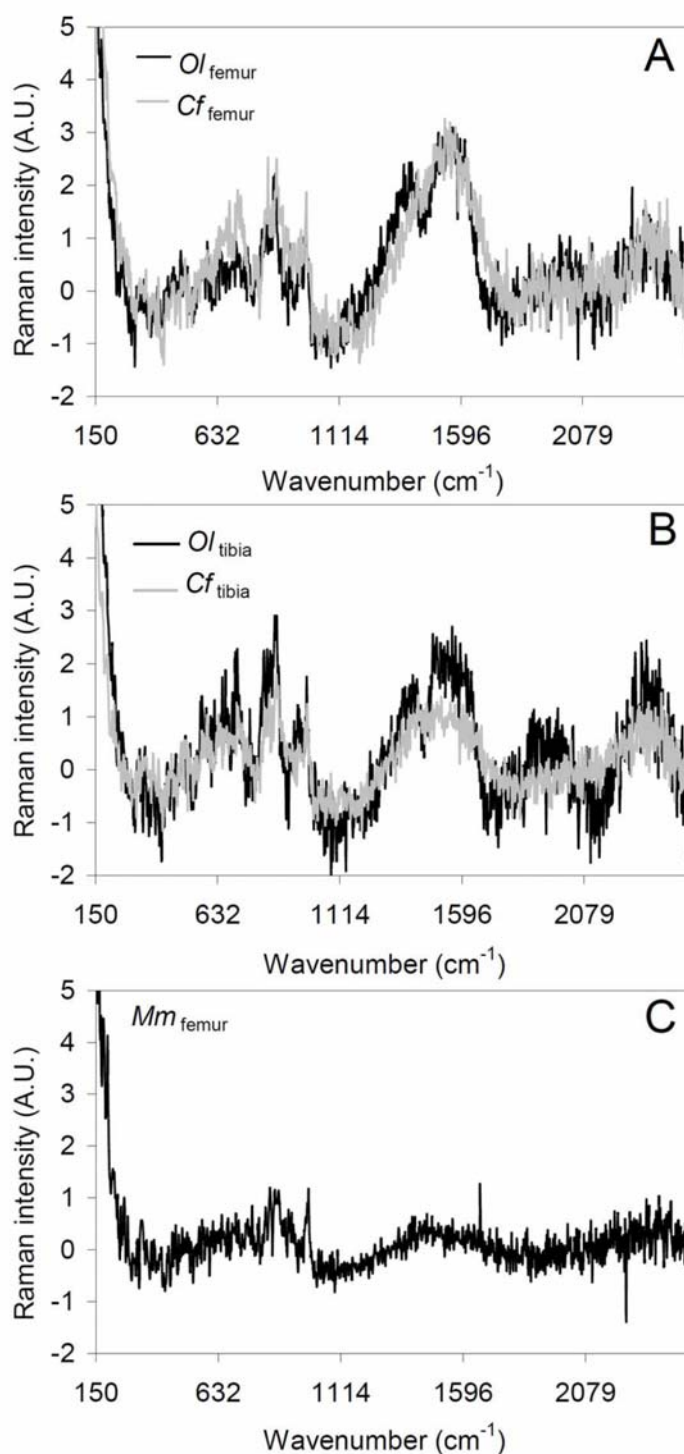
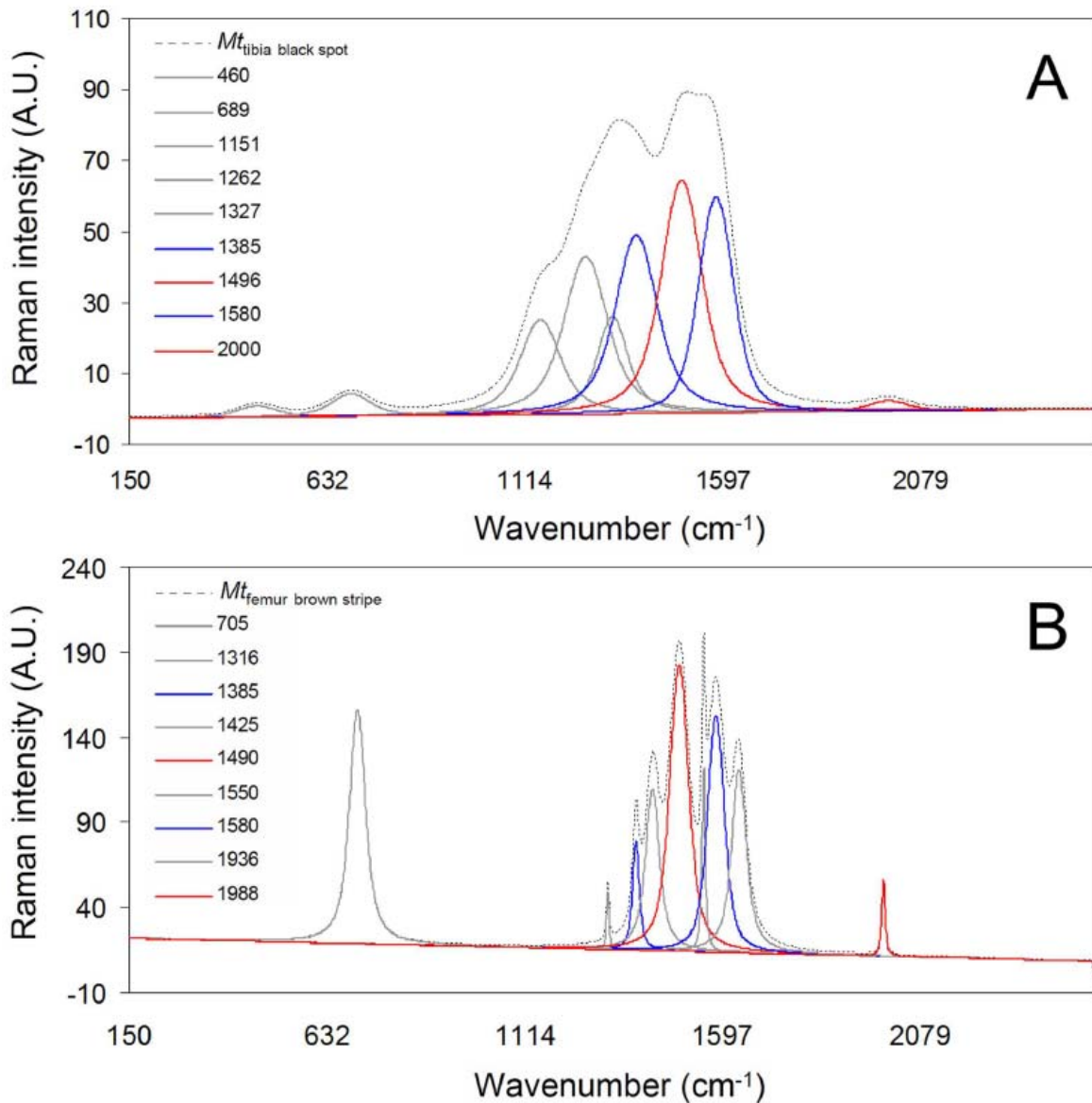


Figure 5.3.S2. Examples of Raman spectra of pigmented body parts of pteromalid wasps, as they appear after having applying the Reference Deconvolution Method. A, black spot on the tibia of *Mesopolobus tibialis*; B, brown stripe on the femur of *M. tibialis*. The dashed black line represents the spectrum of the pigmented area, while the other lines represent the single deconvoluted curves which highlight the different peaks contributing to the spectrum of the pigmented area. Grey lines: chitin-related bands (chitin and *N-Acetyl-D-Glucosamine*); blue lines: *eumelanin*; red lines: *pheomelanin*.



Capítulo IV

Eumelanin and pheomelanin are predominant pigments
in bumblebee (Apidae: *Bombus*) pubescence

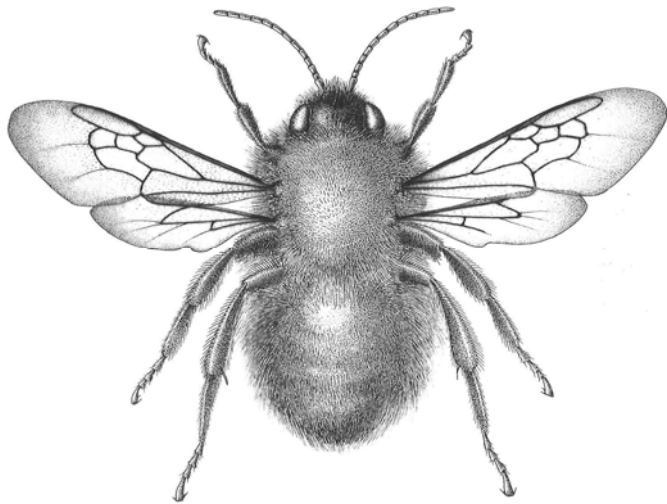
*"El modo de dar una vez en el clavo
es dar cien veces en la herradura".*

Miguel de Unamuno



5.4.1. Resumen

Los abejorros (Hymenoptera: Apidae: *Bombus Latreille*, 1802) son bien conocidos por su importante variación inter e intraespecífica en los patrones de color de la pubescencia, pero la naturaleza química de los pigmentos asociados con estos patrones no se conoce bien. Por ejemplo, a pesar de que se cree que la melanización proporciona colores más oscuros, aún se desconoce qué tipos de melanina son responsables de cada color, y no hay datos concluyentes disponibles para los colores más claros, incluido el blanco. Mediante el uso del análisis por espectroscopía Raman en 12 especies/subespecies de abejorros, probamos la hipótesis de que la eumelanina y la feomelanina, los dos tipos principales de melanina que aparecen en animales, son en gran parte responsables de la coloración de la pubescencia de los abejorros. Eumelanina y feomelanina coexisten en la pubescencia de *Bombus*. La pigmentación negra se debe prevalentemente a eumelanina, aunque con visibles señales adicionales de feomelanina, mientras que la pigmentación amarilla, naranja, roja y marrón incluye claramente feomelanina. Por otro lado, los pelos blancos devuelven señales Raman muy débiles, lo que sugiere que son como consecuencia de despigmentación. No se pueden excluir pigmentos adicionales no melánicos en el pelo amarillo, pero se necesitarían otras técnicas para ser detectados. Los espectros de Raman fueron más similares en pelos de colores similares, sin efecto aparente de la filogenia, y ambos tipos de melaninas aparecen ya al comienzo de la radiación de los abejorros. Sugerimos que las dos formas principales de melanina, en cantidades variables y/o diferentes estados vibracionales, son suficientes para proporcionar casi todo el rango de colores de la pubescencia en *Bombus*. Esto permitiría a estos insectos usar un solo precursor en lugar de sintetizar una variedad de pigmentos químicamente diferentes. Esto estaría de acuerdo con los intercambios de colores comúnmente observados entre segmentos del cuerpo en las especies de *Bombus*.



Publicación

Habitus Bombus pascuorum dusmeti (Vogt, 1909)



Eumelanin and pheomelanin are predominant pigments in
bumblebee (Apidae: *Bombus*) pubescence

Carlo Polidori¹, Alberto Jorge², Concepción Ornos³

¹ Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Avenida Carlos III, s/n, E-45071 Toledo, Spain² Laboratorio de Microscopía, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, E-28006, Madrid, Spain

³ Departamento de Biodiversidad, Ecología y Evolución, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis 12, ES-28040 Madrid, Spain

La versión publicada de este artículo se encuentra en la revista *Peer J* (5:e3300, DOI: 10.7717/peerj.3300).

5.4.2. Abstract

Bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) are well known for their important inter- and intra-specific variation in hair (or pubescence) color patterns, but the chemical nature of the pigments associated with these patterns is not fully understood. For example, despite melanization is believed to provide darker colors, it still unknown which types of melanin are responsible for each color, and no conclusive data are available for the lighter colors, including white. By using Dispersive Raman Spectroscopy analysis on 12 species/subspecies of bumblebees from seven subgenera, we tested the hypothesis that eumelanin and pheomelanin, the two main melanin types occurring in animals, are largely responsible for bumblebee pubescence coloration. Eumelanin and pheomelanin occur in bumblebee pubescence. Black pigmentation is due to prevalent eumelanin, with visible signals of additional pheomelanin, while the yellow, orange, red and brown pigmentation clearly include pheomelanin. On the other hand, white hairs reward very weak Raman signals, suggesting that they are depigmented. Additional non-melanic pigments in yellow hair cannot be excluded but need other techniques to be detected. Raman spectra were more similar across similarly colored hairs, with no apparent effect of phylogeny, and both melanin types appeared to be already used at the beginning of bumblebee radiation. We suggest that the two main melanin forms, at variable amounts and/or vibrational states, are sufficient in giving almost the whole color range of bumblebee pubescence, allowing these insects to use a single precursor instead of synthesize a variety of chemically different pigments. This would agree with commonly seen color interchanges between body segments across *Bombus* species.

Key words: *Bombus*, Eumelanin, Depigmentation, Pigmentation, Pheomelanin, Pubescence, Phenotype, Hymenoptera, Raman spectroscopy.

5.4.3. Introduction

One of the distinct features of animal phenotypic variation is certainly coloration, and in many cases it depends on pigments incorporated in cells and tissues (Bennett & Thery 2007), with melanins being probably the most prevalent ones (Riley, 1997; Nosanchuk & Casadevall, 2006; Gao & García-Pichel, 2011; Eisenman & Casadevall, 2012; Eliason *et al.*, 2013). In insects, for example, a great variability in pigmentation pattern can be found among species, among and within populations, and across different life-stages (Majerus, 1998; Wittkopp & Beldade, 2009), and it depends in many cases on type and degree of melanization (Needham, 1978; Kohler *et al.*, 2007; Lindstedt *et al.*, 2010; Shamim *et al.*, 2014). Melanins protect cells from the damaging effects of ultraviolet (UV) radiation (Brenner & Hearing, 2008; Gao & Garcia-Pichel, 2011) and are also involved in thermoregulation, immune response, cuticle hardening, desiccation resistance and both intra- and inter-specific visual communication (Cerenius & Söderhäll, 2004; Nappi & Christensen, 2005; Dubovskiy *et al.*, 2013; Rózanowska *et al.*, 1999; Riley, 1997; Ramniwas *et al.*, 2013; Searcy & Nowicki, 2005; Price *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2000; Galván & Møller, 2013).

Melanins are heterogeneous metabolites composed by polyphenolic compounds and derive from the oxidative condensation of the aminoacid *L*-tyrosine through enzymatic reactions involving tyrosinase, the key enzyme of melanogenesis in animals (Ito *et al.*, 2011; García-Borrón & Olivares Sánchez, 2011). One of the intermediate in the biosynthesis of melanin is dopachrome, which is then polymerized into various forms of melanin, including eumelanin and pheomelanin, which are the most widespread in nature. Eumelanin is a polymer of indole units produced via formation of 5,6-dihydroxyindole (DHI) and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA), and is produced from intramolecular cyclization of dopaquinone in absence of thiol compounds; this pigment generally leads to dark colorations (García-Borrón

Olivares Sánchez, 2011). Pheomenalin, also deriving from dopaquinone, is a oligomer of sulfur-containing heterocycles (benzothiazine and benzothiazole) produced with the intervention of thiols, such as *L*-cysteine; this pigment generally leads to yellowish to brownish coloration (Riddle, 1909; Simon & Peles, 2010; García-Borrón & Olivares Sánchez, 2011).

Despite both types of melanin were frequently detected in vertebrates (Ito & Wakamatsu, 2003; Roulin *et al.*, 2013; Wolnicka-Glubisz *et al.*, 2012), only eumelanin was known to be widespread in invertebrates (Needham, 1978; Kohler *et al.*, 2007; Lindstedt *et al.*, 2010; Shamim *et al.*, 2014). Indeed, pheomelanin has been detected very recently only in one mollusk (Speiser, DeMartini & Oakley, 2014) and four insect species (a grasshopper, a butterfly, and two parasitoid wasps) (Galván *et al.*, 2015, Jorge *et al.*, 2016, Wakamatsu *et al.*, unpublished data cited in Galván *et al.* (2015)). These recent findings suggest that pheomelanin could be more frequent in insects than previously believed, and bees (Apoidea) are good models to check for its presence given their extremely variable colors, spanning from black to red, yellow, orange and brown (Michener, 2007).

One bee genus that particularly shows huge variation in color patterns is *Bombus* Latreille, 1802 (bumblebees). Indeed, the bumblebee body is covered by a dense layer of hair-like extensions of the cuticle, known as pubescence (Heinrich, 2004; Williams, 2007; Hines & Williams, 2012; Rapti, Duennes & Cameron. 2014). The diversity in bumblebee color patterns is due to the variation in the color of the pubescence, since the underlying cuticle of bumblebee is black. Differences and similarities in color patterns are well known among and within bumblebee species (Dalla Torre, 1880; Vogt, 1911; Rapti *et al.*, 2014), and the diverse, segment-specific patterns seem to have evolved early in the genus history (Cameron *et al.*, 2007). These observations lead to different hypotheses on the adaptive role of color patterns

diversification and convergence in these insects, including thermoregulation (Heinrich, 2004), aposemantism/Mullerian mimicry (Evans & Waldbauer, 1982; Plowright & Owen, 1980) and crypsis (Williams, 2007).

All these efforts in studying the variability and evolution of color patterns in bumblebees contrast, however, with the still unclear evidence on their chemical nature. As far as we know, indeed, previous work based on different analytical tools such as thin layer chromatography (TLC), Spectrophotometry and HPLC/Mass Spectrometry (MS) suggested black, orange, brown and red coloration depending on melanin (without further distinction of melanin types) (Babiy, 1925; Owen & Plowright, 1980; Hines, 2008a). On the other hand, the pigment responsible for yellow color in bumblebees was not determined in detail yet but it was suggested to be possibly a pterin (Hines, 2008a). Furthermore, it is actually unknown whether white is due to a pigment or to the absence of pigments (Hines, 2008a).

Here, by using Dispersive Raman Spectroscopy analysis, we aimed to test which types of melanin occur in bumblebee hairs of different colors. We show for the first time that eumelanin occurs in black hair and pheomelanin in hairs of all the other colors. The only exception is white, which seems to be due to depigmentation.

5.4.4. Materials and methods

Females (either queens or workers, or both) of 11 species (one represented by two subspecies) of *Bombus* from seven subgenera were selected for the study: *Bombus* (*Bombus*) *lucorum* (Linnaeus, 1761) *Bombus* (*Bombus*) *terrestris* Linnaeus, 1758, *Bombus* (*Fervidobombus*) *dahlbomii* Guerin-Meneville, 1835- *Bombus* (*Kallobombus*) *soroensis* (Fabricius, 1777), *Bombus* (*Megabombus*) *gerstaeckeri* Morawitz, 1881, *Bombus* (*Melanobombus*) *lapidarius decipiens* Pérez, 1890, *Bombus* (*Melanobombus*

Capítulo IV: Pigmentación en el género *Bombus*

lapidarius lapidarius (Linnaeus, 1758), *Bombus* (*Pyrobombus*) *monticola* Smith, 1849, *Bombus* (*Thoracobombus*) *humilis* Illiger, 1806, *Bombus* (*Thoracobombus*) *mesomelas* Gerstaecker, 1869, *Bombus* (*Thoracobombus*) *pascuorum dusmeti* Vogt, 1909, and *Bombus* (*Thoracobombus*) *runderarius* (Müller, 1776) (Fig. 5.4.1).

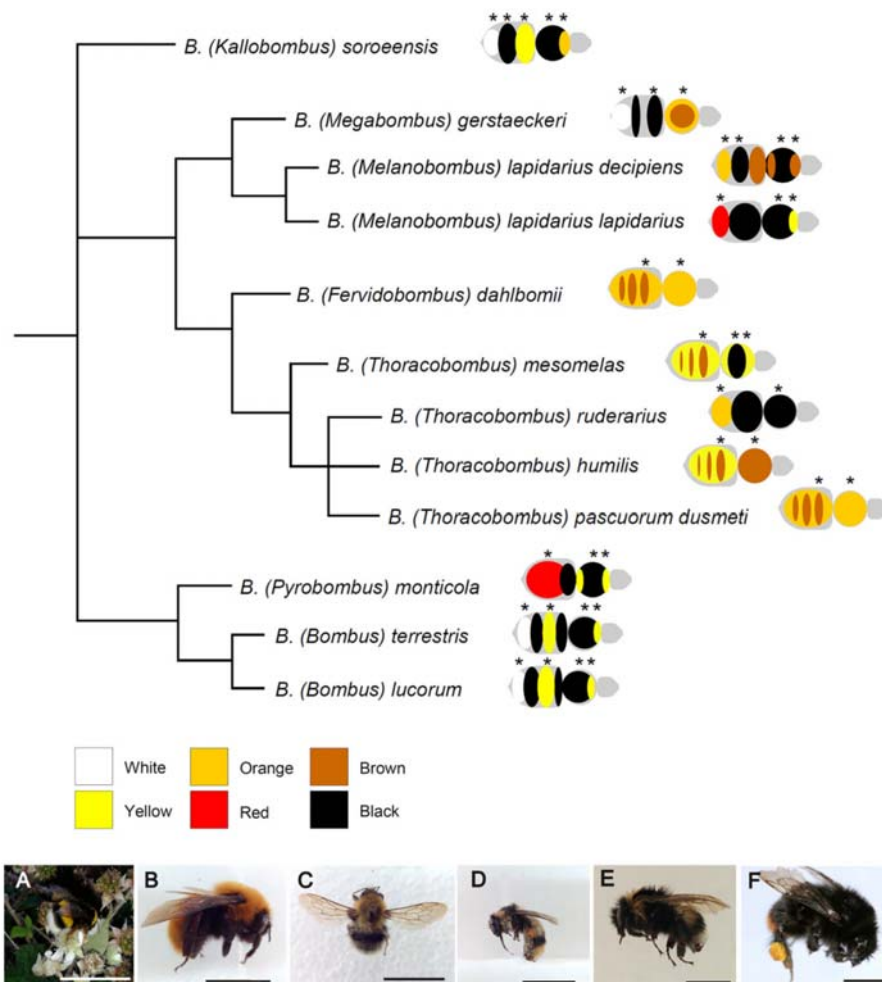


Figure 5.4.1. Phylogenetic relationships among the studied species of *Bombus*, hand-drawn starting from the results published in Cameron (2007). Close to each species/subspecies one finds the simplified color pattern of the pubescence, as observed in the studied individuals; the analyzed areas are indicated by asterisks. The range of colors and corresponding nomenclature is shown below the tree. Representative pictures of some of the studied species/subspecies are at the bottom of the figure: A, *B. terrestris*; B, *B. dahlbomii*; C, *B. gerstaeckeri*; D, *B. lapidarius*

Capítulo IV: Pigmentación en el género *Bombus*

All individuals were collected by netting on flowers in various years and at various localities in Spain and Chile (Ornosa & Ortiz-Sánchez, 2004, Polidori *et al.* 2014), killed by freezing and then deposited in public or private collection as pinned dry specimen (Table 5.4.1). Field collections were approved by the Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (Spain) (permit number: CO/09/106/2010), Comunidad de Madrid (Spain) (permit number: 10/091686.9/15), Junta de Castilla y León (Spain) (permit number: EP/CYL/366/2013), Gobierno de Aragón (Spain) (permit number: CSVM5-1XA8S-75HA5-OUREG), Gobierno de Navarra (granted on 25/05/2009) and Estación Científica de Huinay (Chile) (granted on 18/10/2014). On the whole, 46 individuals (30 workers and 16 queens) were analyzed, 3-4 *per* species/subspecies (Table 5.4.1). In our sample, color patterns were very similar within species between queens and workers (Supplemental Information, Fig. 5.4.S1), so that no further distinction between castes was done during the analysis.

Table 5.4.1. Details of the data collecting of bumblebees (*Bombus* spp.) used in this study. W = worker, Q = queen, UCME = Museo de Entomología de la Universidad Complutense de Madrid, MNCN = Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC).

Subgenus	Species	N	Geographic origin	Collection
<i>Bombus</i>	<i>B. lucorum</i>	4 W	Huesca (Spain) Madrid, Badajoz,	UCME
<i>Bombus</i>	<i>B. terrestris</i>	4 Q	Pontevedra (Spain)	UCME
<i>Fervidobombus</i>	<i>B. dahlbomii</i>	4 W	Huinay, Hualaihué (Chile)	MNCN
<i>Kallobombus</i>	<i>B. soroensis</i>	4 W	León (Spain)	UCME
<i>Megabombus</i>	<i>B. gerstaeckeri</i>	3 W	León, Huesca (Spain)	UCME

Capítulo IV: Pigmentación en el género *Bombus*

		2 Q, 1		
<i>Melanobombus</i>	<i>B. lapidarius decipiens</i>	W	León (Spain)	UCME
		2 Q, 2	León, Navarra, Huesca	
<i>Melanobombus</i>	<i>B. lapidarius lapidarius</i>	W	(Spain)	UCME
<i>Pyrobombus</i>	<i>B. monticola</i>	4 W	Cantabria (Spain)	UCME
		3 Q, 1		
<i>Thoracobombus</i>	<i>B. humilis</i>	W	León, Huesca (Spain)	UCME
<i>Thoracobombus</i>	<i>B. mesomelas</i>	4 W	León (Spain)	UCME
<i>Thoracobombus</i>	<i>B. pascuorum dusmeti</i>	4 Q	Madrid (Spain)	UCME
		1 Q, 3		
<i>Thoracobombus</i>	<i>B. ruderarius</i>	W	Huesca (Spain)	UCME

To analyze if melanins are the responsible for pigmentation of bumblebee hair we used Dispersive Raman Spectroscopy, which was proved to be a useful non-destructive technique to analyze these pigments (Galván *et al.*, 2013; Galván & Jorge, 2015; Jorge *et al.*, 2016), known to be almost completely insoluble in all solvents (Gonçalves *et al.*, 2012). The Raman analysis produces spectra in which signatures of prevalent molecules are visible, allowing their identification through comparisons with published spectra and databases (Colthub *et al.*, 1990; Czamara *et al.*, 2015; Galván & Jorge, 2015). We introduced an intact individual into a Thermo Fisher DXR confocal dispersive Raman microscope (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA), which as associated with Thermo Fisher OMNIC 8.1 software. For each species, we checked for the occurrence of eumelanin and pheomelanin in differently colored hairs as detailed in Fig. 5.4.1, by point-and-shoot analysis. The spatial resolution was 1 μm and the excitation laser source was at 780 nm of 2-7 mW power, which are optimal parameters

for melanin detection in Raman (Galván & Jorge, 2015; Jorge *et al.*, 2016). A 50x confocal objective, a slit aperture of 25 μm and a grating of 400 lines/mm were used to obtain the spectra, which had an average resolution of 2.2–4.4 cm^{-1} in the wavenumber range of 150–2500 cm^{-1} . The typical measured linewidth (FWHH) of an average of 4 spectra in two bands of polystyrene centered at 1002.30 and 1603.06 were 6.2 cm^{-1} and 8.9 cm^{-1} respectively. An integration time of 5 s x 12 accumulations allowed getting an acceptable Signal to Noise Ratio. Pure polystyrene was used to check calibration and aligning of the spectra.

We described the color of each analyzed pubescence area as white, yellow, orange, orange-red/red (red in the following text), orange-brown/brown (brown in the following text) or black. For any given individual and pigmented area, the analysis was repeated four times at different points. We also analyzed for one species (*B. terrestris*) the black ventral side of the thorax, which lacks hairs.

Because the yellow pigment in bumblebees was previously suggested to be due to non-melanin pigments (Babiy, 1925) and probably to a pterin (Hines, 2008a) we performed two additional experiments. First, we carried out the Raman analysis on hair-extracted yellow pigment from 20 workers of one species (*B. terrestris*, one of those with the brightest yellow). Extraction of the yellow pigment from hairs (200 mg on fresh weight) was carried out through acid MeOH and NaHCO_3 0.01 M following Hines (2008a), which used the extracts for chemical characterization with TLC and HPLC/MS, and the extracts were then moved to the Raman microscope. Second, we carried out the Raman analysis on commercially available synthetic 95% solid pterin on KBr disk obtained from Sigma-Aldrich (P1132). Conditions of these Raman analyses were the same as described above.

A visual comparison with spectra retrieved by recent literature and reference database allowed their association with eumelanin or pheomelanin (e.g. Galván *et al.*, 2015; Galván & Jorge, 2015; Huang *et al.*, 2004; De Gelder *et al.*, 2007). Peaks known to be associated with chitin, the fundamental polysaccharide composing the insect cuticle (De Gelder *et al.*, 2007), and its precursor N-Acetyl-D-Glucosamine, the structural monomer of chitin (Jamialahmadi *et al.*, 2011), were also identified by visual inspection. Then, to improve the main peaks identification, the Raman spectra were analyzed by the Reference Deconvolution Method (Middendorf, 1974; Morris *et al.*, 1997) as in Jorge *et al.* (2016), using the Software ORIGIN v.7 software (OriginLab Corporation). This method circumvents distortions affecting the spectral peaks by using a well-known reference signal, and then reconvolutes the spectrum with a Lorentzian lineshape (Middendorf, 1974).

The statistical analysis was carried out on the mean Raman intensity values calculated across individuals for each species/body part/color, giving a total of 47 spectra (data available as Supplemental Dataset). To explore the dissimilarities among the differently pigmented areas and the different species/subspecies based on Raman spectra we used two methods. First, we performed an Agglomerative Hierarchical Clustering (AHC) (Gordon, 1999). This method found relatively homogeneous clusters of cases based on Raman peak values (each case represented by the mean peak values across individuals for a given color, body part and species), and it was performed through Ward's method based on Euclidean distance (dissimilarity) between pairs of objects. The analysis also provides the dissimilarity value that discriminates the major different clusters. Then, using the same Euclidean dissimilarity matrix, we performed a classical Multidimensional Scaling analysis (Torgerson, 1952) for a bi-plot representation of the distribution of the cases in the six color categories. This technique is commonly used to determine a n -dimensional space and corresponding coordinates

for a set of objects, using a single matrix of pair wise dissimilarities between these objects (Borg & Groenen, 2005). The Cluster analysis and the Multidimensional Scaling analysis were carried out in the software XStat 2012 (Addinsoft).

5.4.5. Results

The studied *Bombus* species/subspecies presented a variety of color patterns (Fig. 5.4.1). Some, like *B. terrestris* and *B. lucorum*, present a combination of black, yellow and white; other, like *B. monticola* and *B. lapidarius lapidarius*, present a combination of yellow, orange, and black; other species (e.g. *B. dahlbomii* and *B. pascuorum dusmeti*) present exclusively an orange/brown pubescence (Fig. 5.4.1).

The inspection of Raman spectra revealed that all the colorations found in the bumblebee hairs largely depend on the occurrence of eumelanin and/or pheomelanin, or on the lack of both pigments.

These two peaks were well highlighted through the Reference Deconvolution Method (Fig. 5.4.2). These spectra clearly resembled eumelanin spectra known for other organisms (Huang *et al.*, 2004; Perna *et al.*, 2013; Centeno & Shamir, 2008) as well as the spectrum of synthetic eumelanin (Kim *et al.*, 2015). Major peaks were associated with the vibration of stretching of the hexagonal carbon rings in the molecule structure and with the vibration of three of the six C-C bounds within the rings and with the vibration of the C-H of methyl and methylene groups in the eumelanin polymers (Huang *et al.*, 2004).

The Raman spectra revealed a strong signal of eumelanin, with its typical signature showing two main bands at about 1385 cm^{-1} and at about 1580 cm^{-1} , in the black hair (Fig. 5.4.2).

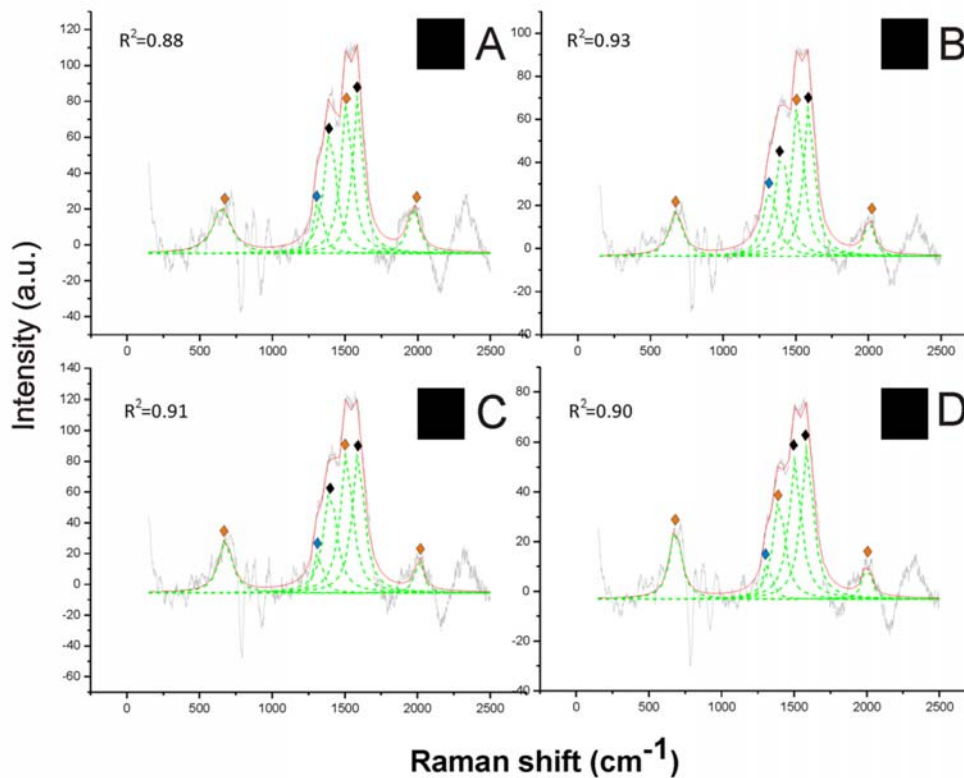


Figure 5.4.2. Examples of Raman spectra of black hair in *Bombus*, and peaks identification after having applied the Reference Deconvolution Method. The grey line represents the Raman spectrum, the dashed green lines represent the single deconvoluted curves, which highlight the different peaks contributing to the spectrum, and the red line represents the sum of the deconvoluted curves (i.e. the adjustment to the spectrum, whose goodness of fit expressed as R^2 value). ♦ signature peaks for eumelanin, ♦ signature peaks for pheomelanin, ♦ signature peaks for chitin. A, thorax of *B. lucorum*; B, thorax of *B. monticola*; C, abdomen of *B. soroeensis*; D, thorax of *B. terrestris*.

Two further peaks at about 1490 cm⁻¹ and 2000 cm⁻¹ from black hair spectra can be associated with the additional presence of pheomelanin (Fig. 5.4.2). These two peaks were found associated with synthetic pheomelanin spectrum (Kim *et al.*, 2015) as well as with pheomelanin spectra in other organisms (Galván *et al.*, 2015). These peaks have been assigned, respectively, by the out-of-plane deformation and the stretching vibration of the phenyl rings in the molecule structure, and to overtone or combination bands (Galván *et al.*, 2013). Thus, black hair seems to include both melanin types.

Opposite to black, the white hair appeared to be due to the absence of any type of melanin (Fig. 5.4.3). These spectra showed a very low Raman intensity signal (maximum about 5 A.U.), particularly when compared with most of the spectra obtained for all the other colors (maximum between about 30 and 150 A.U.), and they are clearly noisy in their patterns (Fig. 5.4.3). The Reference Deconvolution Method confirms that no peaks can be associated with either eumelanin or pheomelanin, though it recognized peaks associated with chitin (see below) (Fig. 5.4.3).

On the other hand, pheomelanin seemed to be the only predominant melanin in the yellow, orange, red and brown colors of the pubescence (Figs. 5.4.4-5). Indeed, the distinct peaks of its signature (1490 cm^{-1} and 2000 cm^{-1}) (confirmed by the Reference Deconvolution Method) were well visible (Figs. 5.4.4-5), while no eumelanin-related peaks were detected.

Other peaks found in all Raman spectra, such as those at 1445 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} and 713 cm^{-1} (Figs. 5.4.1-5) were previously associated with the vibration modes of chitin, while three peaks at 514 cm^{-1} , 625 cm^{-1} and 649 cm^{-1} are characteristic of the N-Acetyl-D-Glucosamine (De Gelder *et al.*, 2007) (Figs. 5.4.1-5). Peaks associated with chitin (713 cm^{-1} and 1401 cm^{-1}) and N-Acetyl-D-Glucosamine (1315 cm^{-1} and 1564 cm^{-1}) were also predominant in the spectrum obtained from hairless cuticle of the ventral side of *B. terrestris* thorax, where no melanin signatures could be detected (Supplemental Information, Fig. 5.4.S2).

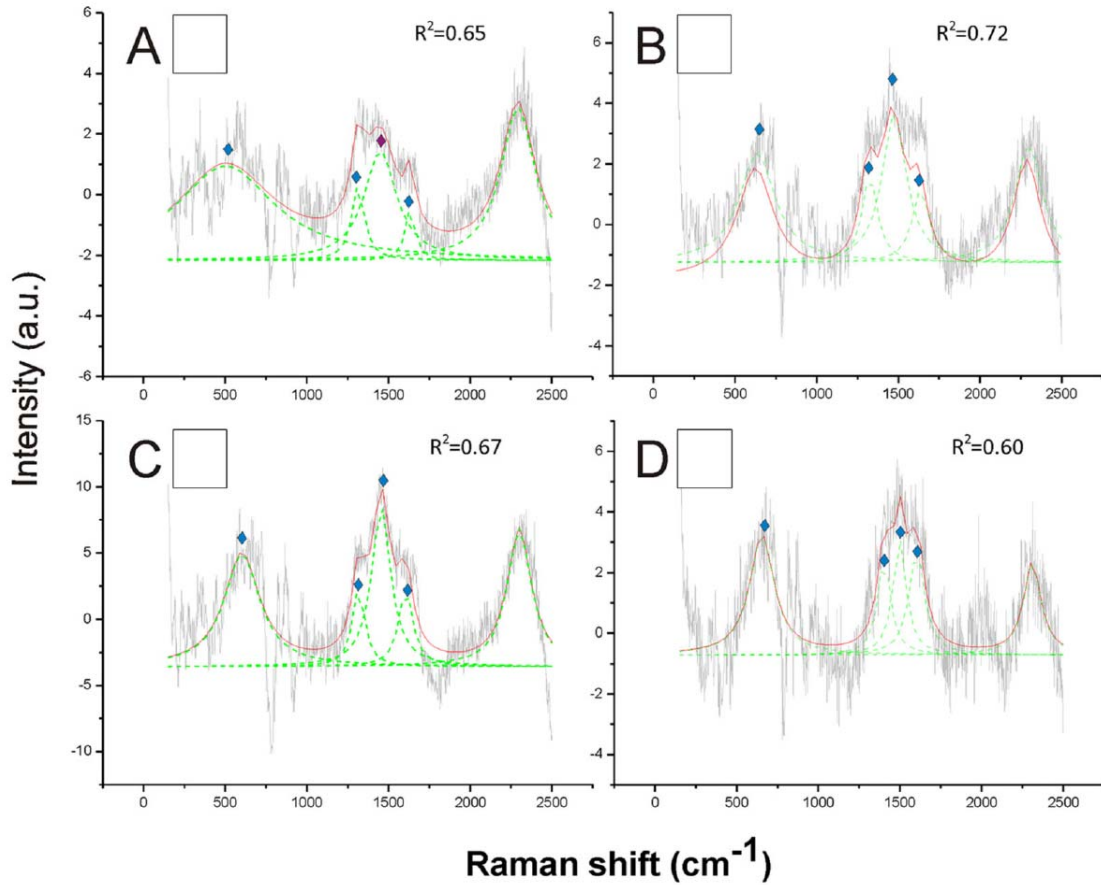


Figure 5.4.3. Examples of Raman spectra of white hair, and of hairless thorax ventral side cuticle, in *Bombus*, and peaks identification after having applied the Reference Deconvolution Method. The grey line represents the Raman spectrum, the dashed green lines represent the single deconvoluted curves, which highlight the different peaks contributing to the spectrum, and the red line represents the sum of the deconvoluted curves (i.e. the adjustment to the spectrum, whose goodness of fit expressed as R² value). ♦ signature peaks for chitin, ◆ signature peaks for N-Acetyl-D-Glucosamine. A, abdomen of *B. lucorum*; B, abdomen of *B. terrestris*; C, abdomen of *B. soroeensis*; D, abdomen of *B. gerstaeckeri*. Note that no melanin peaks and overall very low intensity signal were detected in white hair.

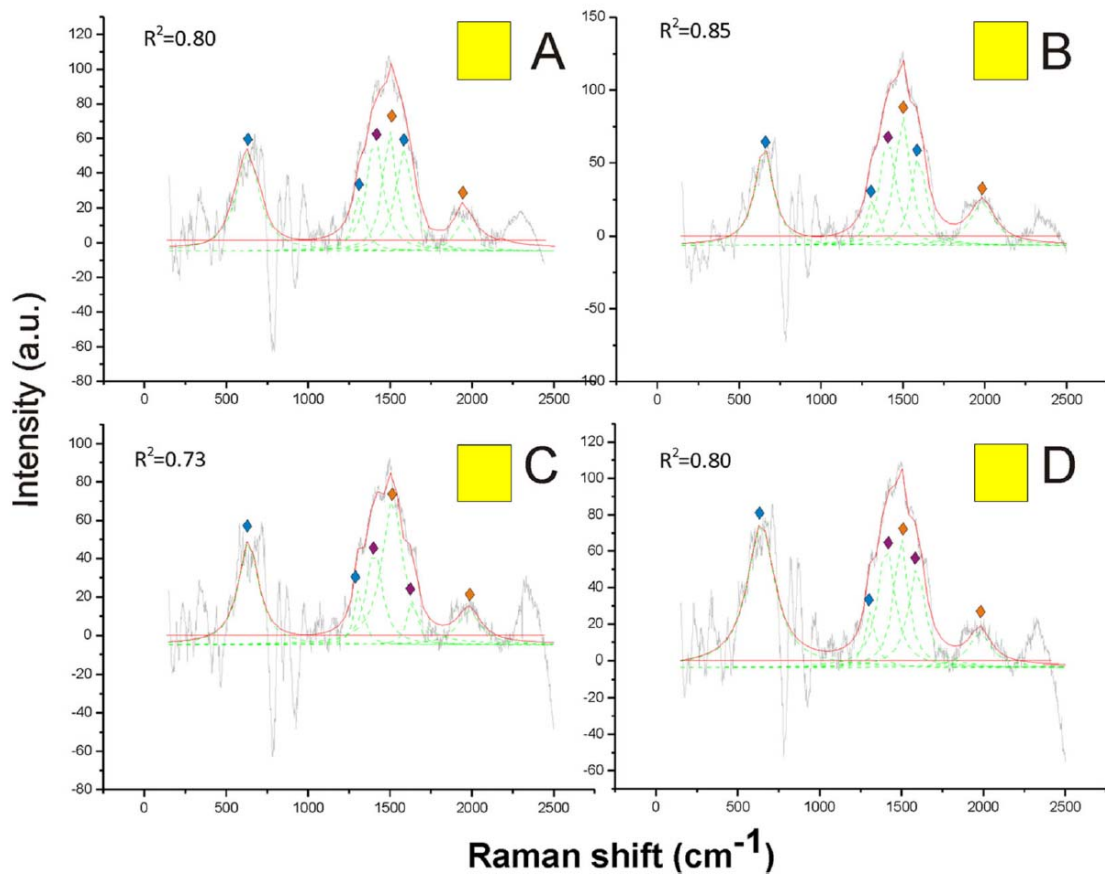


Figure 5.4.4. Examples of Raman spectra of yellow hair in *Bombus*, and peaks identification after having applied the Reference Deconvolution Method. The grey line represents the Raman spectrum, the dashed green lines represent the single deconvoluted curves, which highlight the different peaks contributing to the spectrum, and the red line represents the sum of the deconvoluted curves (i.e. the adjustment to the spectrum, whose goodness of fit expressed as R^2 value). ♦ signature peaks for pheomelanin, ◆ signature peaks for chitin, ◆ signature peaks for *N-Acetyl-D-Glucosamine*. A, abdomen of *B. soroeensis*; B, abdomen of *B. terrestris*; C, thorax of *B. lucorum*; D, thorax of *B. monticola*.

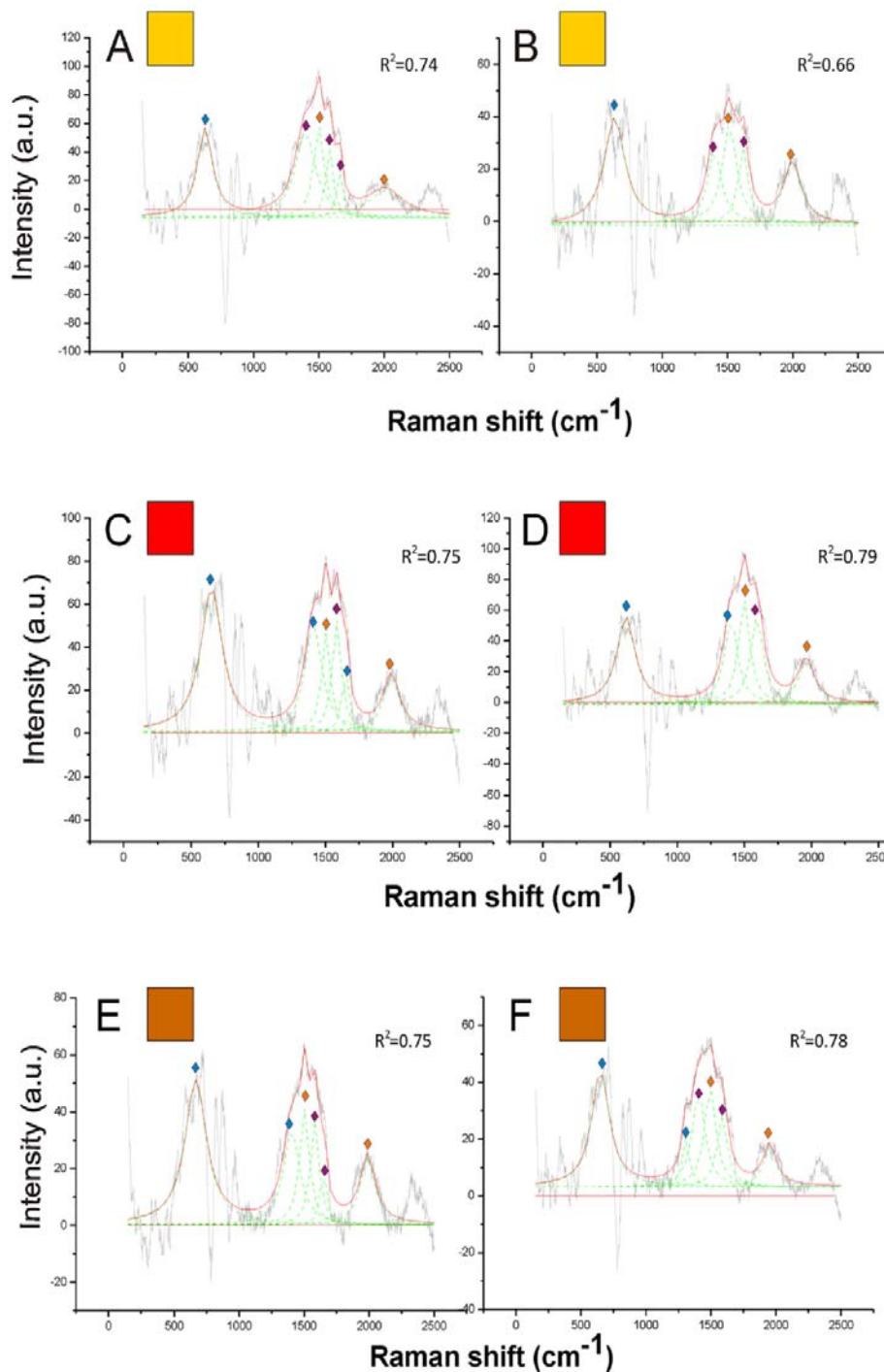


Figure 5.4.5. Examples of Raman spectra of orange, red and brown hair in *Bombus*, and peaks identification after having applied the Reference Deconvolution Method. The grey line represents the Raman spectrum, the dashed green lines represent the single deconvoluted curves, which highlight the different peaks contributing to the spectrum, and the red line represents the sum of the deconvoluted curves (i.e. the adjustment to the spectrum, whose goodness of fit expressed as R² value). ♦ signature peaks for pheomelanin, ◆ signature peaks for chitin, ◆ signature peaks for *N-Acetyl-D-Glucosamine*. A, orange hair on the abdomen of *B. mesomelas*; B, orange hair on the thorax of *B. dahlbomii*; C, red hair on the abdomen of *B. lapidarius lapidarius*; D, red hair on the abdomen of *B. monticola*; E, brown hair on the abdomen of *B. pascuorum dusmeti*; F, brown hair on the thorax of *B. humilis*.

The Raman spectrum of the hair-extracted yellow pigment failed to reveal, as expected from its very low solubility, the pheomelanin signature (Supplemental Information, Fig. 5.4.S3A); in addition, it did not reveal the typical strong peaks of pterin (687 cm^{-1} and 1309 cm^{-1}), which were clearly visible in the spectrum obtained from synthetic pterin (Supplemental Information, Fig. 5.4.S3B).

Despite both pheomelanin and pterin are composed of heterocycles and may thus have typical peaks in similar positions, actually one of the major peaks of pterin (1309 cm^{-1}) did not fall very close to the closest pheomelanin peak (at 1490 cm^{-1}). A high peak at $\approx 1300\text{ cm}^{-1}$, was well visible in our spectra from yellow as well as from other colors, while Hines (2008a) excluded pterin occurrence in non-yellow hairs; this peak was very close to one of the typical peak of chitin (1315 cm^{-1}), so it may not represent pterin. The other important peak for pterin (687 cm^{-1}) also may fall under a high peak found in our spectra ($\approx 700\text{ cm}^{-1}$), but, again, it is visible in spectra of all colors and is very close to the chitin-related peak at 713 cm^{-1} .

The cluster analysis (AHC) based on the Raman spectra reasonably agreed with the presence and with the type of melanin, as well as, to some extent, with the observed color (Fig. 5.4.6A). The first bifurcation of the dendrogram separated all white parts (no melanins) (group 4), together with few yellow-orange parts, from the rest of sample (Fig. 5.4.6A). These few yellow-orange spectra (four out of 19) falling close to the white spectra had especially poor signals. The melanin signature is visible, but the maximum signal is low (15-25 A.U.), closer to that in white spectra (4-11 A.U.) than to that in the other spectra (50-125 A.U.) (Fig. 5.4.6B). Within the remaining large group of the dendrogram, there was a tendency to separate yellow and orange parts (Fig. 5.4.5A, group 3) from darker colors, i.e. red, brown and black (Fig. 5.4.5A, group 2). Then, a further bifurcation discriminated all black parts (eumelanin + pheomelanin) (group 1) from the rest (pheomelanin only) (Fig. 5.4.5A). Body part (thorax or

abdomen) did not seem to affect the distribution of cases in the dendrogram. For example, different black body parts were intermixed in group 1 (Fig. 5.4.6A). Similarly, phylogeny of the studied species did not seem to account for dissimilarity between cases. For example, spectra of *B. soroensis*, *B. lucorum*, *B. terrestris* and *B. monticola* clustered in either group 1 or group 3 depending on being black or yellow (Fig. 5.4.6A).

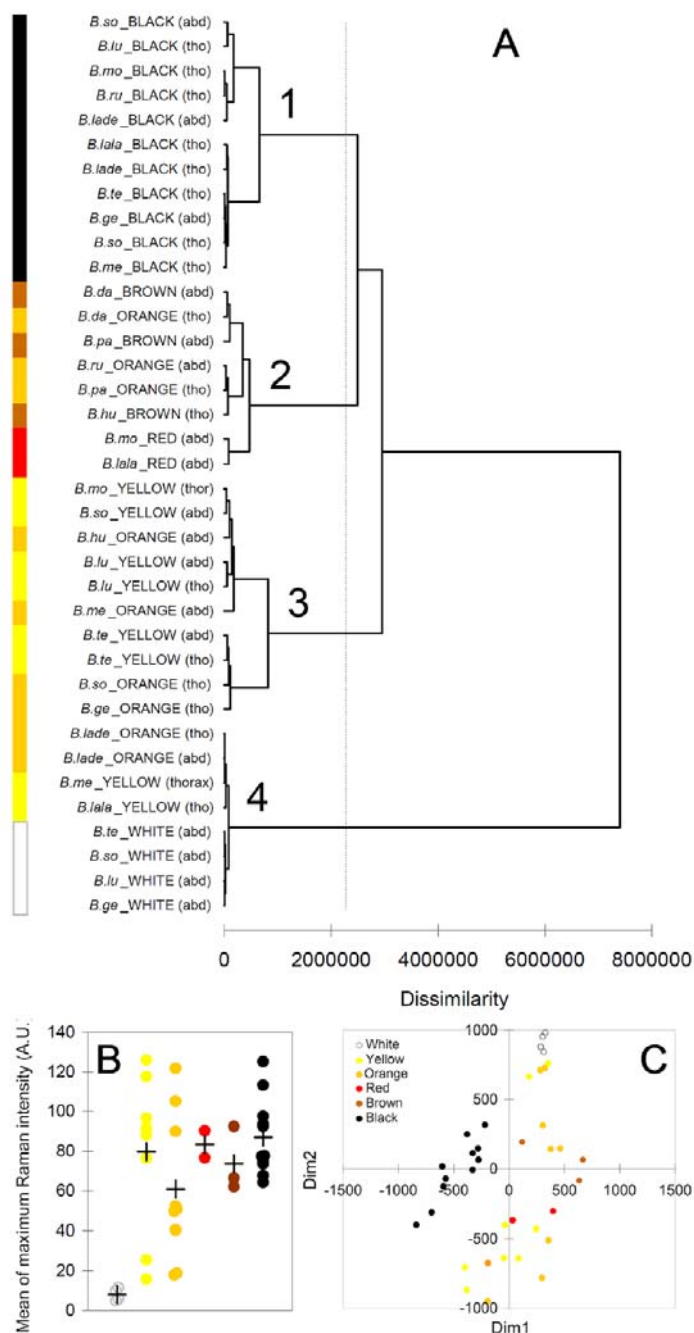


Figure 5.4.6. Results from multivariate analyses. A, Dendrogram obtained from the Agglomerative Hierarchical Clustering (dashed vertical line represents the dissimilarity value which discriminates the major different clusters); B, relationship between colors and maximum intensity signals in the Raman spectra (+ symbols identify mean values across species/color/body part); C, Multi-Dimensional Scaling plot, based on the mean values of each peak across individuals of each species/color/body part. Species abbreviations in (A): *B.so*: *B. soroensis*, *B.lu*: *B. lucorum*, *B.mo*: *B. monticola*, *B.ru*: *B. ruderarius*, *B.lade*: *B. lapidarius decipiens*, *B.lala*: *B. lapidarius lapidarius*, *B.te*: *B. terrestris*, *B.ge*: *B. gerstaerckeri*, *B.me*: *B. mesomelas*, *B.da*: *B. dahlbomii*, *B.pa*: *B. pascuorum dusmeti*, *B.hu*: *B. humilis*.

The plot derived from the Multidimensional Scaling analysis (Fig. 5.4.6C) confirmed the pattern shown in the cluster analysis.

Black body parts are concentrated in an area on the left (negative values of D1) of the plot, roughly around null D2; other dark colors (red and brown) seems also to remain in similar position respect to D2, but have positive D1 values. Lighter colors (yellow, orange) seem also to have mostly positive D1, but having mainly similar or higher values of D2 compared with darker colors. White body parts are strongly clustered at the upper limit of D2 in a characteristic position, together with the few low-signal spectra of yellow and orange.

Bumblebee hair color variation is thus predominantly due to both types of melanin (black), pheomelanin only (yellowish to brownish), or lack of pigmentation (white). Raman spectra even varied to some extent with the darkness degree of the observed colors, and not with phylogeny of the studied species.

5.4.6. Discussion

Despite no previous analytical study was carried out to determine the association between colors and type of melanin in *Bombus*, our findings confirm the long-time suggested hypothesis that melanin is responsible for black and orange/red/brown coloration (Babiy, 1925; Hines, 2008a). While the association between black and eumelanin is not surprising, since this pigment was often reported in insects' black body parts (e.g. Needham, 1978; Lindstedt *et al.*, 2010; Galván *et al.*, 2015), pheomelanin was reported in very few cases (Galván *et al.*, 2015; Jorge *et al.*, 2016), and to date only suspected for bumblebee reddish hairs (Hines, 2008a). These colorations have a relatively simple genetic basis (Owen & Plowright, 1980; Owen *et*

al., 2010) and may result from changes made during the same developmental pathway (Hines, 2008a).

The fact that melanin biosynthesis is at the basis of all colors except white is especially interesting because future molecular investigations would allow comparisons with other species in which melanin pathways and genetic control of pigmentation were studied (Wittkopp *et al.*, 2003; Lemonds *et al.*, 2016). These new studies may find a starting point from our work and by the recent description of the draft genomes of two bumblebee species (Sadd *et al.*, 2015), which revealed the presence of the *dopa-decarboxilase* and *prophenoloxidase*, two genes involved in pigmentation/melanin synthesis in other insects (Koch *et al.*, 1998; Zufelato *et al.*, 2004).

Black, which we have showed is due a mixture of eumelanin and pheomelanin, is the most common pubescence color across bumblebee species (Rapti *et al.*, 2014), suggesting that it may serve as a ground plan color which forms contrasts with other colors (and thus aposemantism). Interestingly, black hair pigmentation in bumblebees seems to be different from black cuticle in other insects and in spiders, in which eumelanin is the only melanin type present (Galván *et al.*, 2015, Hsiung *et al.*, 2015; Jorge *et al.*, 2016). The fact that eumelanin and pheomelanin both occur in black hairs agrees with observations on the color's change experienced by bumblebees during their adult life. For example, Friese and Wagner (1910) noted that bumblebees shift from grey-white hair (in callows) to either yellow or red, the latter in some cases further shifting to black. Grey colors in callow may be due to traces of both eumelanin and pheomelanin, and these shifts may be associated first to an increase of pheomelanin (in the route to yellow and red) and then to an increase of eumelanin (from red to black). Hines (2008a) showed a lack of fluorescent pigments in callow hairs fated to become yellow, thus also suggesting that only melanins (which do not fluoresce) at very low abundance occur in very young individuals.

Our Raman experiments were not sufficient to clearly associate yellow with a non-melanic pigment. In the past, the yellow in bumblebee hair was suggested to be due to either flavonoids (Stein, 1961) or pterins (Hines, 2008a). By TLC and HPLC/MS chemical analyses, Hines (2008a) discarded the presence of flavonoids and suggested that the yellow pigment is a small fluorescent heterocyclic compound, as a pterin, remarkably similar in properties across bumblebee lineages. Indeed, the yellow pigment shows the characteristic shifts in pH expected of pterins and its mass (177 mw) excludes the possibility of both flavonoids and melanins or melanin intermediates (which furthermore do not fluoresce as pterins do) (Hines, 2008a). However, in contrast with this finding, we obtained clear pheomelanin signature from yellow hairs, and no correspondence with the typical Raman spectra of synthetic pterin. In addition, our experiments showed that the Raman did not detect pterins in the hair-extracted yellow pigment, though this could be due to its low abundance. Thus, at the moment we can prove that pheomelanin also occurs in yellow hair, but we cannot either confirm or reject the possibility that pterin also occurs. New experiments with different techniques are necessary to solve this point.

Apart from melanins and the still unclear role of pterin, no other pigments seem to be involved in bumblebee hair coloration. Indeed, based on the TLC and HPLC/MS analytical results of Hines (2008a), no pigments are xanthopterins (which confers for example yellow in some butterflies's wing scales and yellow cuticle in some social wasps (Wjignen *et al.*, 2007; Plotkin *et al.*, 2009)) and certainly not leucopterins (which confers white, not yellow, coloration). Furthermore, available Raman spectra for xanthopterin revealed a high peak at $\approx 1150 \text{ cm}^{-1}$ that lacked in our spectra (Saenko *et al.*, 2013). Carotenoids (having a very high peak at $\approx 1150 \text{ cm}^{-1}$ absent in our spectra) and ommochromes (having a very high peak at $\approx 1800 \text{ cm}^{-1}$ absent in our spectra), also found in arthropods (Nijhout, 1997; Heath *et al.*, 2013), can also be excluded by

comparisons with available Raman spectra (Merlin, 1985; Hsiung *et al.*, 2015) and following Hines (2008a).

Our results seem to support previous considerations arisen from the study of color pattern diversity and frequency. Rapti *et al.* (2014) found that various orange and yellow colors occur at high frequency in the abdomen, suggesting that different pigment classes may be derived from the same pigment that varies in density within the setae. This pigment was unknown at the time of this consideration, and we now show that it is pheomelanin. In addition, changes from yellow to black or black to yellow are among the most common changes in color (Rapti *et al.*, 2014). This now makes sense given that pheomelanin is present in both black (together with eumelanin) and yellow hair; thus, a decrease or disappearance of eumelanin in black hair could turn hair to brighter colors. This does not contrast with the possibility that, particularly in yellow hairs, pheomelanin co-occurs with a non-melanin pigment (Hines 2008a). Pheomelanin would thus lead to all the other colors except white by varying in intensity and different modes in frequency of the stretching vibration of the hexagonal aromatic rings, symmetric and asymmetric tensions, in- and out-of-plan deformations and other vibration characteristics (Socrates, 2004; Galván *et al.*, unpublished data), which affect how the pigment interact with radiation and in turn affect the pigment's optical properties. Overall it would be thus not necessary for bumblebees to produce a wide range of pigments to diversify their color patterns. The use of both melanin types seemed to be ancient in *Bombus*, when looking at the more recent phylogeny of the genus (Fig. 5.4.1 and Cameron *et al.*, 2007). This probably allowed bumblebees promptly diversifying their color patterns during the genus radiation (Rapti *et al.*, 2014).

A very different situation occurs with white color, which was clearly associated with a lack of melanins in our study. The very noisy and weak spectra obtained from white hairs, with no clear peaks, did not point towards the presence of any other types

of pigments (at least within the Raman detection power). A similar result was obtained for white body parts in spiders (Hsiung *et al.*, 2015). In other cases, such as in *Bombyx mori*, white is probably due to uric acid and pteridine (Okamoto *et al.* 2008). In our case, the spectra from white hair resemble the spectra from hairless ventral side of the thorax, where only chitin-related peaks are visible. Despite we did not found signature of eumelanin in the hairless black cuticle in *Bombus*, this pigment is, however, likely to occur, as melanins are known to be responsible for dark coloration in insects in general (Needham, 1978); however, eumelanin is probably located too deep within the cuticle matrix to be detected by Raman. Based on her TLC and HPLC/MS analytical results, Hines (2008a) also raised the possibility that white hairs are depigmented, but did not discard the possibility that small amounts of the non-melanic pigment of yellow hair occur, a hypothesis that needs further experiments to be tested.

The provided evidence that both eumelanin and pheomelanin are predominant in bumblebee hair opens to new studies in which concentrations of these pigments could be measured in individuals living in different environments or reared under different laboratory experiments, in order to link melanization, temperature and oxidative stress (which is linked with pheomelanin production (Galván *et al.*, 2015; Napolitano *et al.*, 2014)). This may help understanding the observed, and still not fully understood, variations of bumblebee color patterns along latitudinal gradients (Pekkarinen, 1979; Williams, 2007).

Supplemental Information

Fig. 5.4.S1. Patterns of coloration in queens and workers of *Bombus* species. A-B: *B. lapidarius lapidarius* queen (dorsal-lateral), C-D: *B. lapidarius lapidarius* worker (dorsal-lateral), E-F: *B. humilis*_queen (dorsal-lateral), G-H: *B. humilis*_worker (dorsal-lateral) I-J: *B. lapidarius decipiens*_queen (dorsal-lateral), K-L: *B. lapidarius decipiens*_worker (dorsal-lateral), M-N: *B. ruderarius* queen (dorsal-lateral), O-P: *B. ruderarius* worker (dorsal-lateral).



Fig. 5.4.S2. Raman spectrum of hairless, black ventral side of thorax in *B. terrestris*, and peaks identification after having applied the Reference Deconvolution Method. The grey line represents the Raman spectrum, the dashed green lines represent the single deconvoluted curves, which highlight the different peaks contributing to the spectrum, and the red line represents the sum of the deconvoluted curves (i.e. the adjustment to the spectrum, whose goodness of fit expressed as R^2 value). ♦ signature peaks for chitin, ♦ signature peaks for N-Acetyl-D-Glucosamine. Note that no melanin peaks were detected in hairless cuticle.

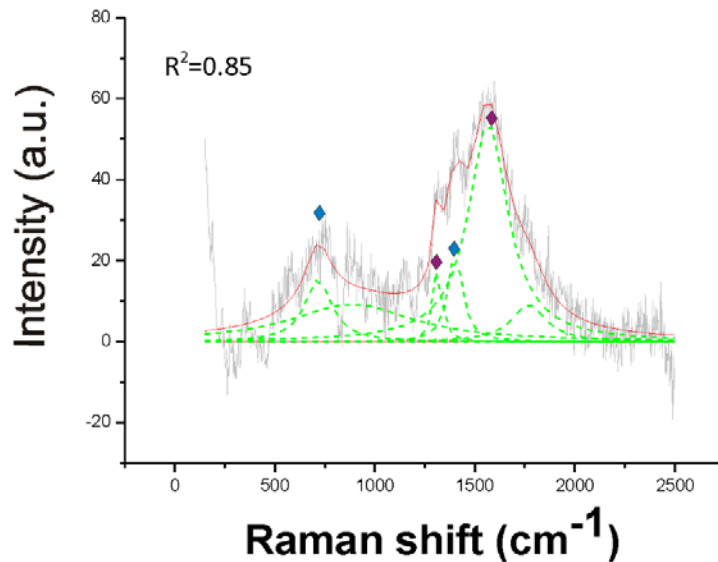
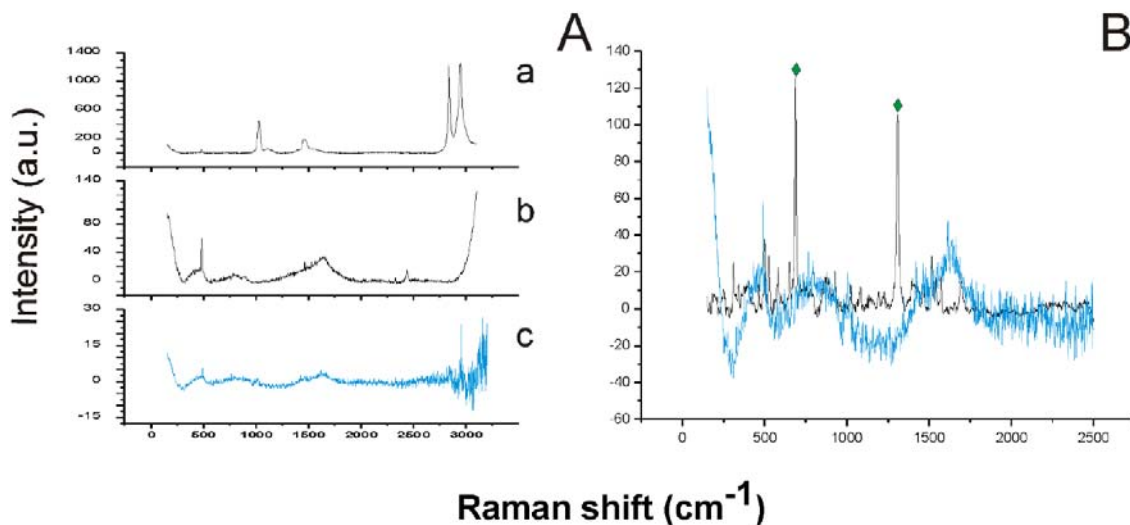


Fig. 5.4.S3. Raman spectra of yellow hair extracts and synthetic pterin. A: yellow hair extracts from *B. terrestris* (c) and associated solvents (a, acidified methanol; b, sodium carbonate), and B: synthetic pterin (black line) and yellow hair extracts (blue line). ♦ signature peaks for pterin. Note that yellow hair extracts did not return a spectrum with neither visible pheomelanin signature nor visible pterin signature.

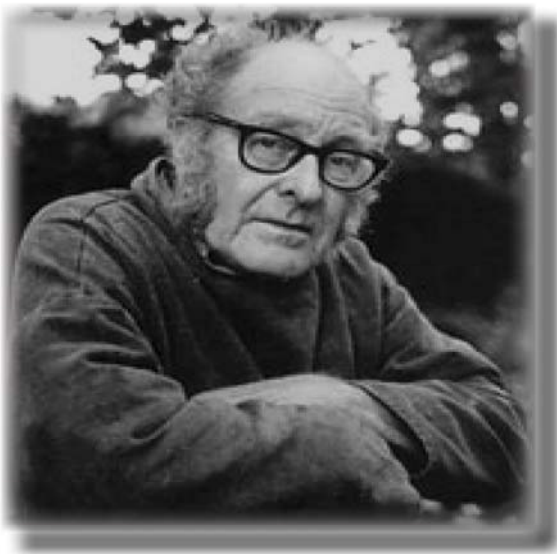


Capítulo V

Antennal sensilla in male gall-wasps and insights on the evolution of sexual dimorphism in sensory equipment (Hymenoptera: Cynipidae)

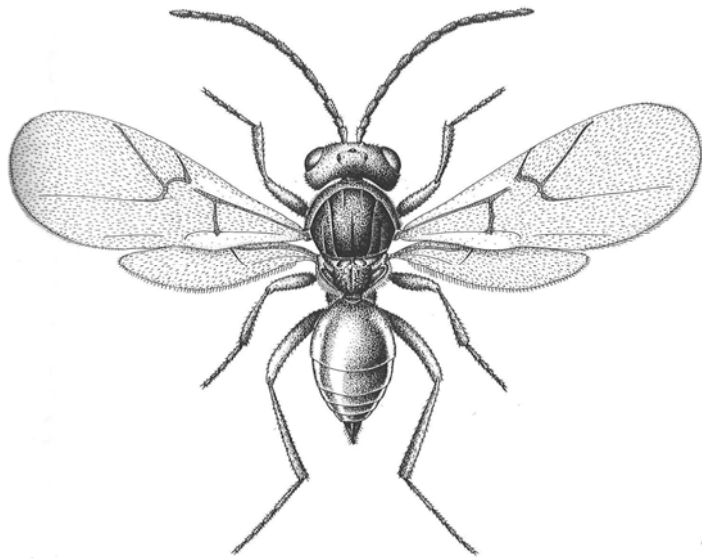
"Observando la naturaleza aprenderá que cultivar un solo producto o mantener una sola especie animal en un mismo lote de tierra está fuera del orden natural de las cosas. Deseará pues nutrir a los animales y las plantas de su tierra para asegurar la supervivencia de la más amplia variedad posible de formas naturales, cuya interacción recíproca comprenderá y fomentará".

Jhon Segmour



5.5.1. Resumen

La diversidad de estructuras de las antenas de los insectos involucradas en la comunicación es todavía poco conocida debido al número limitado de estudios comparativos y el enfoque casi exclusivo en un solo sexo. Dentro de los Cynipoidea, un estudio reciente sobre hembras de las avispas de las agallas (Hymenoptera: Cynipidae) y de algunos de sus linajes próximos (Ibaliidae y Figitidae) mostró una gran diversidad del equipo sensorial antenal. Presentamos aquí un estudio en machos. Mediante análisis por Microscopía Electrónica de Barrido en 45 especies de Cynipoidea (de las cuales 30 son avispas inductoras de agallas), cubriendo la mayoría de los linajes conocidos. Encontramos que el flagelo antenal masculino es generalmente filiforme y tiene en general ocho tipos de sensilas (s. placoidea (SP), s. celocónica (SCo-A), s. campaniforme (SCa), s. basicónica (SB) y s. tricoidea (ST-A, ST-B, ST-C, ST-D)) (5 a 8 tipos por especie). El número y la disposición de las sensilas varían enormemente entre y dentro de los linajes, con un limitado efecto de la filogenia en esta variación. Mediante el uso de datos de 27 especies para las cuales se analizaron ambos sexos, encontramos que los machos generalmente poseen un menor número de tipos sensilares que las hembras en inductores de agallas (comparado con especies que no forman agallas). Los sexos compartieron 40%-100% de los tipos sensilares independientemente de su biología. Los machos parecen poseer un número total mayor de SP que las hembras, siendo esta diferencia claramente mayor en los inductores de agallas. Estas observaciones sugieren que 1) las hembras de los cínipidos inductores de agallas pueden haber desarrollado un equipo sensorial más rico en respuesta a actividades exclusivas de las hembras (por ejemplo, reconocimiento de la planta) y 2) que los machos pueden haber desarrollado una densidad mayor de sensila dedicada al reconocimiento de pareja. Es necesaria una corrección formal del ancestro común para confirmar estas hipótesis.



Publicación

Habitus Aylax papaveris (Perris, 1839)

Antennal sensilla in male gall-wasps and insights on the evolution of sexual dimorphism in sensory equipment (Hymenoptera: Cynipidae)

Alberto Jorge¹, Carlo Polidori², José L. Nieves-Aldrey³

¹Laboratorio de Microscopía, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, E-28006, Madrid, Spain

²Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Avenida Carlos III, s/n, E-45071 Toledo, Spain

³Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, ES-28006, Madrid, Spain

Artículo en preparación para su próxima publicación.

5.5.2. Abstract

The diversity of insect antennal structures involved in communication is still poorly known because of the limited number of comparative studies and the often exclusive focus on only one sex. Within Cynipoidea, a recent study on gall-wasps (Hymenoptera: Cynipidae) and some of their non-gall associated relatives (Ibaliidae and Figitidae) showed a great diversity of the antennal sensillar equipment both between and within lineages. In order to better understand possible patterns of this diversity, we here present a study in males. By Scanning Electron Microscopy analysis on 45 species of Cynipoidea (of which 30 gall-wasps) from most known lineages, we found that the male antennal flagellum is generally filiform and bears overall eight types of sensilla (s. placoidea (SP), s. coeloconica (SCo-A), s. campaniformia (SCa), s. basiconica (SB) and s. trichoidea (ST-A, ST-B, ST-C, ST-D)) (5 to 8 types *per species*). The number, size and arrangement of sensilla greatly varied among and within cynipoid lineages, with a small effect of phylogeny on this variation. By using data of 27 species for which both sexes were analysed, we found that males generally possess a lower number of sensillar types than females in gall-inducers and a greater number of sensillar types than females in non-gall-inducers. Sexes shared 40%-100% of sensillar types independently from their biology. Males seem to own an overall greater number of SP than females, such difference being clearly larger in gall-inducers. These observations altogether suggest that 1) gall-inducing female cynipids may have evolved a richer sensillar equipment in response to female-only activities (e.g. plant host recognition) and 2) that males may have evolved higher density of sensilla devoted to mate recognition. A formal correction for common ancestry is necessary to confirm these hypotheses.

Key words: antennal morphology; antennal sensilla; sensilla placoidea; Cynipoidea; sexual dimorphism; gall-wasp, parasitoid.

5.5.3. Introduction

In insects, antennae are the main body appendages bearing structures involved in communication (Todd & Baker 1999), since they receive a wide range of stimuli used to find and/or recognize food, oviposition site, nest-mates, natural enemies, mating partner and suitability of environmental conditions (Altner & Prillinger 1980; Dicke & Grostal 2001; Chapman 2003). The morphological filters between these stimuli and the insect brain consist in specialized receptors that form part of the antennal epidermis, the antennal sensilla, which are made of cuticular components, sensory neuron(s) and sheath cells. Depending to their function, which varies from mechanical to olfactory, gustatory, hygrothermal or CO₂-sensing, antennal sensilla vary in their morphology, ranging from hair-like to plate-like structures and having single or double cuticular walls which may be aporous, single-porous or multi-porous (Hartenstein 2005; Ozaki & Tominaga 1999; Keil 1997; van Baaren et al. 2007).

Antennal sensilla in insects greatly vary in their occurrence, density, and distribution along the antennae both between sexes within a species and among species (Ågren 1978; Jourdan et al. 1995; van Baaren et al. 1999). Because of their great variability, antennal sensory system can be thus potentially be useful to study both phylogenetic relationships among taxa (Walther 1983) and morphological adaptations to a variety of selection pressures, such as those related with feeding and foraging habits, habitat type, mating systems, and social behaviour (Spaethe et al. 2015; Chapman 1982; Wcislo 1995; Polidori et al. 2012).

Perhaps because of the huge behavioural and ecological diversity in their life-history traits, one of the insect order for which antennal sensory system was more studied is the Hymenoptera. Indeed, within Hymenoptera one can find endo- and ectoparasitoids, predators, pollinivorous and herbivorous developing into plant tissues, as

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

well as solitary and social species (Gullan & Cranston 2010). Detailed information is in particular available for non-Aculeata (“Parasitica”) wasps in the superfamilies Ichneumonoidea, Chalcidoidea and Cynipoidea (van Baaren et al. 1999; Voegelé et al. 1975; Norton & Vinson 1974; Navasero et al. 1991; Polidori & Nieves-Aldrey 2014; Olson & Andow 1993; Isidoro et al. 1996; Amornsak et al. 1998; Ochieng et al. 2000; Bleeker et al. 2004; Roux et al. 2005; Bourdais et al. 2006; Gao et al. 2007; Dweck & Gadallah 2008; Onagbola et al. 2009) and for Apoidea within Aculeata (Ågren 1977, 1978; Ågren & Hallberg 1996; Dietz & Humphreys 1971; Galvani et al. 2012; Polidori et al. 2012; Fialho et al. 2014; Carvalho et al. 2017; Gupta 1992; Ravaiano et al. 2014; González-Vaquero et al. 2017). Among all these studies, however, only few involved large comparative analyses within specific lineages (i.e. families or below) (Galvani et al. 2012; Polidori et al. 2012; Hashimoto 1990; Ågren & Hallberg 1996; Ware & Compton 1992; Polidori & Nieves-Aldrey 2014), thus limiting hypotheses on the factors involved in their evolution. A second limitation to a solid reconstruction of the evolution of sensory equipment in Hymenoptera is that almost all the comparative studies published to date involve only one sex, typically females (Galvani et al. 2012; Polidori et al. 2012; Polidori & Nieves-Aldrey 2014; Fialho et al. 2014; Klopstein et al. 2010; Symonds & Elgar 2013). Males were analysed generally in single- or few-species studies (e.g. Viggiani & Mazzone 1982; Streinzer et al. 2013; Tormos et al. 2013; Polidori et al. 2016), but, as far as we know, not in large comparative studies.

With more than 3000 described species worldwide, the Cynipoidea constitutes one of the largest families of Hymenoptera (Ronquist 1999; Nieves-Aldrey 2001). The superfamily is particularly notable because includes both parasitoid lineages (the basal Ibalidae and Liopteridae, and the derived Figitidae) and the also derived, extremely rich family Cynipidae (gall-wasps), which is secondarily herbivorous and represents an amazing radiation of gall-inducing insects (Csóka et al. 2005). Gall-wasps are

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

characterized by a life-cycle that includes the formation (or in some cases the usurpation (inquilinity) (Ronquist 1994)) of complex structures on plants, the galls, in which the larvae, protected from predators and parasitoids, feed and develop (Ronquist & Liljeblad 2001; Stone & Cook 1998; Stone & Schönrogge 2003).

In the recent large study on female antennal morphology and sensilla of Cynipoidea (51 species from all extant families and cynipid tribes), Polidori & Nieves-Aldrey (2014) found the antenna to be generally filiform, rarely clavate, and harbouring overall 12 types of sensilla: s. placodea (SP), two types of s. coeloconica (SCo-A, SCo-B), s. campaniformia (SCa), s. basiconica (SB), five types of s. trichoidea (ST-A, B, C, D, E), large disc sensilla (LDS) and large volcano sensilla (LVS). A great variability in sensillar equipment both among and within lineages was found, though few traits seemed to be unique to specific cynipid tribes, and few preliminary evolutionary trends were suggested (Polidori & Nieves-Aldrey 2014). This large study, together with few other information available for additional species of Figitidae (Butterfield & Anderson 1994; Tormos et al. 2013; Polidori et al. 2016) suggests that female antennal morphology and sensillar equipment in Cynipoidea are likely to be the complex results of different interacting pressures and their use in phylogenetic reconstructions should be thus avoided. It is still unknown, however, which patterns occur in males. Data in literature are very scarce for males, with antennal sensilla of only four species in two genera within the family Figitidae analysed to date (Tormos et al. 2013; Polidori et al. 2016).

Studying males is thus important not only to complete a detailed overview of sensillar apparatus in Cynipoidea, but also to give insights on the evolution of sensillar apparatus, since greater sexual dimorphism would be expected if the stimuli used by the two sexes to guide their activities are more different (Hansson et al. 2011). Here,

we present a large comparative study on male Cynipoidea, thus possibly having the first hymenopteran lineage with both sexes analysed in detail.

5.5.4. Materials and Methods

Males of 30 species of Cynipidae, 14 species of Figitidae and one species of Ibalidae were investigated (Table 1). Figitidae and Ibalidae were included in the study as a sort of “outgroup” to help suggesting hypothesis on the evolution of antennal sensilla in gall-wasps (the focus taxon). The selected gall-wasps species spanned all the main lineages of gall-inducers and inquilines (Table 1). Voucher specimens are deposited at Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC) (Madrid, Spain) (MNCN).

For all species except those collected in Chile no specific permissions were required for the locations/activities, since collections were done in non-protected areas. The species from Chile were collected in the Reserva Nacional Los Queules, and the permit for such collection was issued by the Corporación Nacional Forestal (CONAF). The field studies did not involve endangered or protected species.

Antennae were separated from the head under light microscopy and then gold-coated after mounting on adhesive carbon pads attached to aluminium stubs. In case the specimens come from the MNCN collection they were not gold-coated and they were introduced entire and pinned.

The morphological study was based on the analysis of SEM images obtained using an ESEM QUANTA 200 microscope (FEI Company, Oregon-USA) at the MNCN. High vacuum conditions (resolution: 3.0 nm at 30 kV (SE), 10 nm at 3 kV (SE), and 4.0 nm at 30 kV (BSE)) were used. The accelerating voltage was 26 kV, the high vacuum was 0.40-0.50 torr, and the working distance was 10 mm. Antennae were observed in

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

dorsal, ventral and lateral view. The whole antenna was inspected in search of the different sensillar types.

The flagellomeres were designated F_1 to F_A (the latter being the apical flagellomere, that could be F_{10} to F_{13} , see Results), in a proximal to distal direction, with F_n designating the flagellomere just before F_A . Most of morphological details were recorded in particular in F_A , F_n and F_1 - F_4 , based on previous studies on Cynipoidea (Tormos et al. 2013; Polidori et al. 2016; Polidori & Nieves-Aldrey 2014).

For the inventory of sensillar types we referred to the recent comparative study carried out on female Cynipoidea (Polidori & Nieves-Aldrey 2014) and to the Hymenoptera Anatomy Ontology (HAO) project portal (Hymenoptera Anatomy Consortium 2017; Yoder et al. 2010). In Cynipoidea, five main types of sensilla occur on the antennae, though this classification should be considered, for some sensilla types, as preliminary because the internal structure and function of different types of sensilla are not yet fully known (Altner 1977). Sensilla placodea are multiporous, elongate, plate-like sensilla with a large surface area (HAO reference: http://purl.obolibrary.org/obo/HAO_0000640). Sensilla coeloconica, for which two types were described in Cynipoidea, are poreless sensilla composed of a cuticular peg standing on the antennal surface and possessing a “collar” of wrinkled cuticle surrounding the peg, which is set in a distinct cuticular depression (pit) (HAO reference: http://purl.obolibrary.org/obo/HAO_0002001). Sensilla campaniformia are characterized by a button-like knob with a small irregular surface emerging from an opening in the centre of a domed, smooth, circular cuticular disk (HAO reference: http://purl.obolibrary.org/obo/HAO_0001973). Sensilla basiconica are hair-like, characterized by a grooved surface and a thick peg which is apically porous (HAO reference: http://purl.obolibrary.org/obo/HAO_0002300).

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

Table 1. Classification, biology and collection site for the cynipoid species included in the study. Depository: JLNA — J. L. Nieves-Aldrey collection, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.

Taxon	Biology	Collection country
Cynipidae: Aulacideini		
<i>Antistrophus silphii</i> Gillette 1891	Galler on <i>Silphium</i> (Asteraceae)	Spain
<i>Aulacidea hieracii</i> (Linnaeus 1758)	Galler on <i>Hieracium</i> (Asteraceae)	Spain
<i>Hedickiana levantina</i> (Hedicke 1928)	Galler on <i>Salvia</i> (Lamiaceae)	Jordan
<i>Isocolus lichtensteini</i> (Mayr 1882)	Galler on <i>Centaurea</i> (Asteraceae)	Spain
<i>Neaylax verbenacus</i> (Nieves-Aldrey 1988)	Galler on <i>Salvia</i> (Lamiaceae)	Spain
<i>Panteliella fedtschenkoi</i> (Rubsaaen 1896)	Galler on <i>Phlomis</i> (Lamiaceae)	Romania
Cynipidae: Aylacini		
<i>Barbotinia oraniensis</i> (Barbotin 1964)	Galler on <i>Papaver</i> (Papaveraceae)	Spain
<i>Iraella luteipes</i> (Thomson 1877)	Galler on <i>Papaver</i> (Papaveraceae)	Spain
Cynipidae: Ceroptresini		
<i>Ceroptres</i> sp.	Gall-inquiline of Cynipini	Mexico
Cynipidae: Cynipini		
<i>Andricus grossulariae</i> Giraud 1859	Galler on <i>Quercus</i> (Fagaceae)	Spain
<i>Andricus quercusradicis</i> (Fabricius 1798)	Galler on <i>Quercus</i> (Fagaceae)	Spain
<i>Biorhiza pallida</i> (Olivier 1791)	Galler on <i>Quercus</i> (Fagaceae)	Spain
<i>Callirhytis cameroni</i> (Medianero & Nieves-Aldrey 2014)	Galler on <i>Quercus</i> (Fagaceae)	Panama

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

<i>Plagiotrochus australis</i> (Mayr 1881)	Galler on <i>Quercus</i> (Fagaceae)	Spain
<i>Pseudoneuroterus saliens</i> (Kollar 1857)	Galler on <i>Quercus</i> (Fagaceae)	Spain
<i>Trigonaspis synaspis</i> (Hartig 1841)	Galler on <i>Quercus</i> (Fagaceae)	Spain
Cynipidae: Diastrophini		
<i>Periclistus brandtii</i> (Ratzeburg 1832)	Gall-inquiline of <i>Diplolepis</i> (Diplolepidini)	Spain
<i>Xestophanes potentillae</i> (Retzius in De Geer 1773)	Galler on <i>Potentilla</i> (Rosaceae)	Spain
Cynipidae: Diplolepidini		
<i>Diplolepis mayri</i> (Schlechtendal 1877)	Galler on <i>Rosa</i> (Rosaceae)	Spain
Cynipidae: Eschatocerini		
<i>Eschatocerus acaciae</i> Mayr 1881	Galler on <i>Prosopis</i> (Fabaceae)	Argentina
Cynipidae: Paraulacini		
<i>Cecinothofagus ibarrae</i> Nieves-Aldrey & Liljeblad 2009	Gall-inquiline of <i>Aditrochus</i> (Pteromalidae)	Chile
Cynipidae: Pediaspidini		
<i>Pediaspis aceris</i> (Gmelin 1790)	Galler on <i>Acer</i> (Sapindaceae)	Spain
Cynipidae: Phanacidini		
<i>Phanacis centaureae</i> Förster 1860	Galler on <i>Centaurea</i> (Asteraceae)	Spain
<i>Timaspis phoenixopodos</i> Mayr 1882	Galler on <i>Lactuca</i> (Asteraceae)	Spain
Cynipidae: Synergini		
<i>Lithonecrus papuanus</i> (Nieves-Aldrey & Butterill)	Gall-inquiline of unknown host on <i>Lithocarpus</i>	Papua New Guinea
<i>Rhoophilus loewi</i> Mayr 1881	Gall-inquiline of <i>Scyrotis</i> (Lepidoptera)	South Africa

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

<i>Saphonecrus lusitanicus</i> (Tavares 1901)	Gall-inquiline of <i>Andricus</i> + <i>Plagiotrochus</i>	Spain
<i>Synergus mesoamericanus</i> Ritchie & Shorthouse 1987	Gall-inquiline of Cynipini	Panama
<i>Synergus physocerus</i> Hartig 1843	Gall-inquiline of <i>Trigonaspis</i>	Spain
<i>Synergus umbraculus</i> (Olivier 1791)	Gall-inquiline of <i>Andricus</i>	Spain
Figitidae: Anacharitinae		
<i>Acanthaegilips</i> sp.	Endoparasitoid of Neuroptera	Colombia
<i>Anacharis</i> sp.	Endoparasitoid of Neuroptera	Spain
<i>Xyalaspis</i> sp.	Endoparasitoid of Neuroptera	Spain
Figitidae: Aspicerinae		
<i>Callaspidia notata</i> (Boyer de Fonsc., 1832)	Endoparasitoid of Diptera: Cyclorrhapha	Spain
<i>Melanips</i> sp.	Endoparasitoid of Diptera: Cyclorrhapha	Spain
Figitidae: Charipinae		
<i>Alloxysta</i> sp.	Endoparasitoid of Hymenoptera	Spain
Figitidae: Eucoilinae		
<i>Hexacola</i> sp.	Endoparasitoid of Diptera	Spain
<i>Tropidoeucoila</i> sp.	Endoparasitoid of Diptera	Spain
Figitidae: Figitinae		
<i>Figites</i> sp.	Endoparasitoid of Diptera	Spain
<i>Lonchidia</i> sp.	Endoparasitoid of Diptera	Spain
<i>Neralsia</i> sp.	Endoparasitoid of Diptera	Colombia

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

<i>Sarothrus</i> sp.	Endoparasitoid of Diptera	Spain
Figitidae: Parnipinae		
<i>Parnips nigripes</i> (Barbotin 1963)	Gall-parasitoid of <i>Barbotinia</i> (Aylacini)	Spain
Figitidae: Plectocynipinae		
<i>Plectocynips pilosus</i> (Ros-Farre 2002)	Gall-parasitoid or gall-inquiline of <i>Aditrochus</i> (Pteromalidae)	Chile
Ibaliidae		
<i>Ibalia leucospoides</i> (Hochenwarth 1785)	Endoparasitoid of Hymenoptera	Spain

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

Sensilla trichoidea are also hair-like structures and are classified in sub-types (five in Cynipoidea) depending on length, morphology of the hair and its insertion in the cuticle (HAO reference: http://purl.obolibrary.org/obo/HAO_0002299). Two additional sensillar types were very rarely found in Cynipoidea (two species). The “large disc sensilla” (HAO reference: http://purl.obolibrary.org/obo/HAO_0002303) and the “large volcano sensilla” (HAO reference: http://purl.obolibrary.org/obo/HAO_0002302), both exclusively occurring in F_A .

Once we checked for all types of sensilla in each individual, we explored the relationships among species based on the presence/absence of the different sensillar types in the antennae through a hierarchical cluster analysis, using Ward’s method based on Euclidean distances (dissimilarity) between pairs of objects.

The morphological component of this study includes 34 characters (Table 2). The characters are based on antennal and flagellar morphology, on occurrence, distribution and size of the different sensillar types (Table 2). Some characters are not applicable to all species and these were coded as missing data (-), while few doubtful assignments to character states were coded as “?”. (Table 2). In the text, characters are referenced in the form, e.g. “21-1”, where “21” is the character and “1” the character state.

The characters and character states are described below.

1. Number of completely separated flagellomeres: (0) 11; (1) 12; (2) 13 (3) >13
2. Length of F_1 : (0) short or almost equal of F_2 length (<1, range 0.7-0.9); (1) equal or maximum 1.2 longer than F_2 ; (2); >2 longer than F_2 (range 2-5).
3. Relative length of F_n . (0) < 2 longer than wide (range of length/width ratio 1.2-1.7); (1) 1.8-2.5 longer than wide; (2) >2.5 longer than wide (range of length/width ratio 2.6-4.6)

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

4. Sensilla placodea (SP) on F_1 : (0) absent; (1) present only apically; (2) present on entire F_1 .
5. SP on F_2 : (0) absent; (1) present.
6. SP on F_3 : (0) absent; (1) present.
7. SP on F_4 : (0) absent; (1) present.
8. Arrangement of SP on F_n : (0) arranged in one row (1) two rows (2) three rows; (3) >3 rows.
9. Number of SP visible in each row: (0) 2-5; (1) 6-8; (2) 8-12; (3) 13-16
10. Relative separation of SP on a row: (0) widely separated (> as width of a sensillum) (1) narrowly separated (< as width of a sensillum); (2) closely spaced, almost contiguous.
11. Shape of SP: (0) almost flat, only slightly or not rising on the segment; (1) ridge-like, clearly raising on the segment.
12. Relative extension of the SP: (0) not reaching distal margin of segment; (1) reaching the distal margin of segment; (2) more or less overlapping the distal margin of segment.
13. Shape of a SP: (0) linear, with parallel margins; (1) more or less sinuate.
14. Relative length of setae on F_n (before last three), relative to width of flagellomere: (0) very short (<0.2, range of setae length/ F_n width ratio 0.06-0.19), (1) medium sized (range 0.2-0.4), large (>0.4, range 0.41-0.98).
15. Sensilla coeloconica type A (SCo-A) in the last flagellomere F_A : (0) absent; (1) present.

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

16. Number of SCo-A in last flagellomere: (0) 1; (1) 2; (2) 3.
17. Relative position of SCo-A on a flagellomere: (0) on or close the distal margin, (1) far from the distal margin.
18. Relative size of the pit of a SCo-A (compared with width of penultimate flagellomere): (0) small (range 0.03 - 0.05), (1) medium size (range 0.06 - 0.08); (2) large (range 0.10 – 0.18).
19. Maximum number of SCo-A in a flagellomere: (0) 1, (1) 2; (2) 3.
20. Shape of margin of a SCo-A: (0) flat; (1) slightly raising.
21. Relative position of the bulb of a SCo-A: (0) sunken, not reaching margin; (1) reaching margin or slightly raising from the margins.
22. Shape of the bulb of SCo-A: (0) pointed apically; (1) blunt apically.
23. Number of visible segments on the SCo-A bulb (not coded, range 5-11).
24. Sensilla campaniformia (SCa): (0) present; (1) absent.
25. Shape of SCa: (0) convex; (1) flat; (2) concavous.
26. Sensilla basiconica (SB): (0) absent; (1) present.
27. Relative number and arrangement of SB: (0) single or very few scattered on the flagellum; (1) several not arranged in rows; (2) arranged in two rows of erect sensilla on distal flagellomeres; (3) arranged as a crown on the apical part of last flagellomere.
28. Sensilla trichoidea type A (ST-A): (0) absent; (1) present
29. Sensilla trichoidea type B (ST-B): (0) absent; (1) present.
30. Disposition or arrangement of ST-B: (0) only on distal part of flagellomeres; (1) not only at distal part.

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

31. Relative length of ST-B (relative to width of a flagellomere): (0) short (>0.3 , range 0.09-0.29); (1) medium sized (range 0.3-0.5); (2) long (>0.5 , range 0.6-1).

32. Number of ST of A-B types (altogether) on Fn measured in a row along its length: (0) very few (1-2), (1) some (4-9); (2) many (10-15); (3) very dense and abundant (>15 , range 15-39).

33. Sensilla trichoidea type C (ST-C): (0) absent; (1) present

34. Sensilla trichoidea type D (ST-D): (0) absent; (1) present.

Male Cynipoidea also possess a typical structure on the basal flagellomeres, i.e. the Release and Spread Structure (RSS), bearing a pored area connected to an internal gland which produces sexual pheromones (Isidoro et al. 1999). We did not analyse this structure in this study, which is exclusively devoted to the sensilla.

We generated a hand-made phylogenetic tree of the studied species based on the recent phylogenetic reconstruction available in Ronquist et al. (2015), based on molecular + morphological + life-history data, *plus* phylogeny proposed by Buffington et al. (2012) (for the position of Plectocynipinae), and few unpublished data (J. L. Nieves-Aldrey) (Fig. 1). Despite in such studies not all nodes were highly supported, we feel that overall this scenario provides a useful instrument to advance some preliminary hypothesis on the evolution of male antennal sensillar equipment, as well as on the evolution of sexual dimorphism in sensory system.

We use data of from the present study and from Tormos et al. (2013), Polidori & Nieves-Aldrey (2014), Polidori et al. (2016) and Robertson and Gandhi (2018).

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

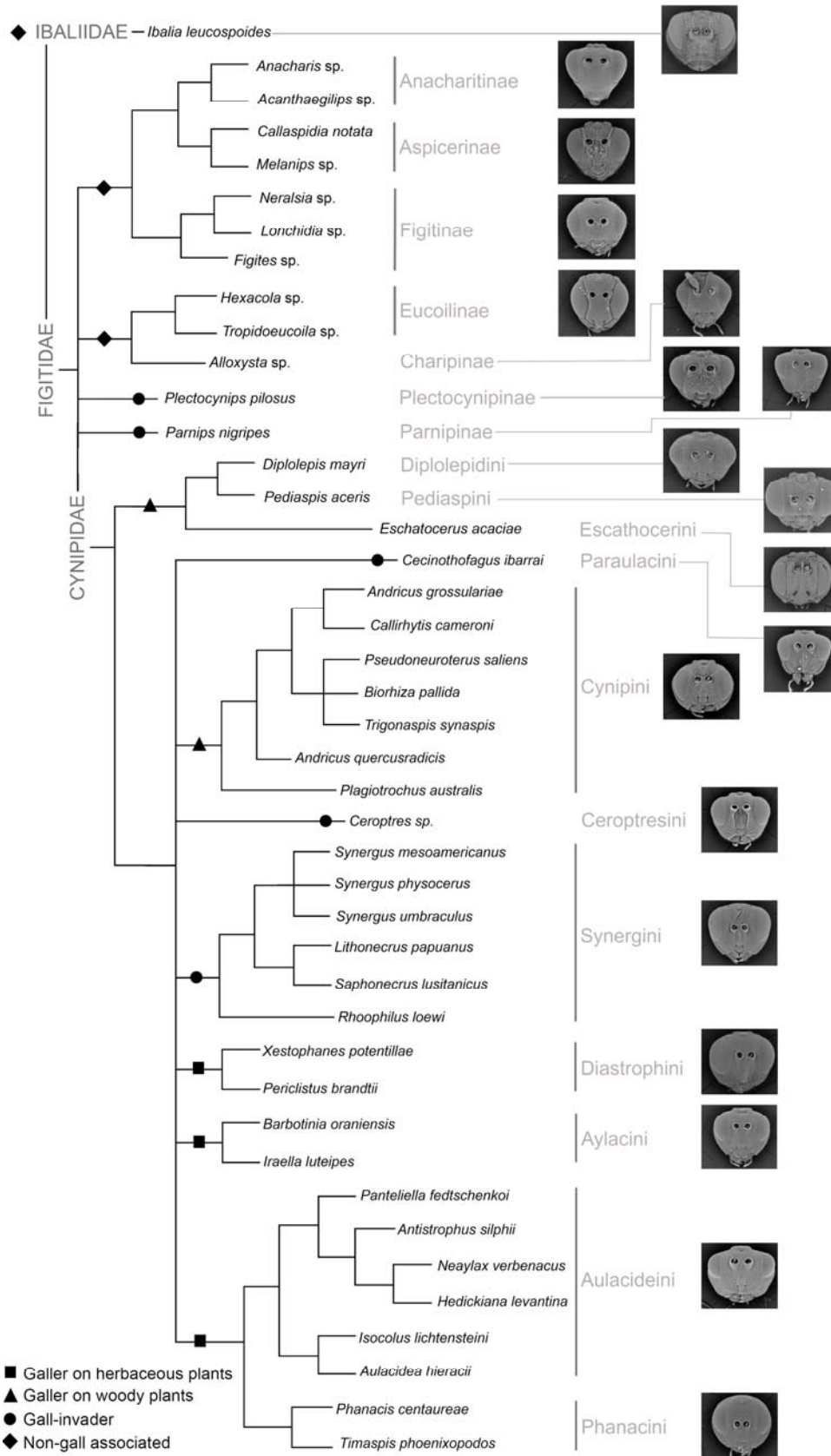


Figure 1. Phylogeny of the studied taxa, as retrieved from recent studies bases on both morphology and molecular markers (see Methods), with biology shown. If more than one species within a clade share the same biology, the biology-symbol was shown at the base of the whole group of species.

We identified a total of 27 species having both sexes analysed, and then we calculated the sexual dimorphism (male/female ratio) for the following traits: number of flagellomeres, number of sensillar types, estimated total number of SP on the antenna (using characters 5-9 or as provided from the inspected papers) and overlap of sensillar diversity (i.e. how similar is the sensillar apparatus in the two sexes based on the presence/absence of the different types of sensilla). The latter was calculated as the number of sensillar types shared by both sexes.

Pearson correlation test was used to verify the association between variables across the 27 species, while to test for differences in sexual dimorphism of these traits among the two main life-history groups (gall-inducers (i.e. all Cynipidae except gall-inquilines) and non-gall-inducers (i.e. Ibalidae, Figitidae and cynipid gall-inquilines)) we used Analysis of Variance (ANOVA).

5.5.5. Results

The antennae of male Cynipoidea consist of a scape, a pedicel and a flagellum consisting of 11 to 17 flagellomeres (character 1: Fig. 2). The lowest number (11) was found in exclusively in the cynipid tribe Eschatocerini, while 12 flagellomeres were found in about half of the analysed species including all Figitidae excluding Eucoilinae and Plectocynipinae, and among Cynipidae in Aulacideini (except *Panteliella fedtschenkoi*), in the genus *Andricus* (Cynipini), in Diastrophini, in Diplolepidini, in Phanacidini and in Roophilus (Synergini). Thirteen flagellomeres were found in about half of the species, including Ibalidae and members of many tribes of Cynipini. No species presented 14-16 flagellomeres, while Plectocynipinae possess 17.

The length of F_1 was variable among species, when considered in relation to F_2 (character 2: Fig. 2, Table 2). Ibalidae, most of herb-galling cynipids and Eschatocerini

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

have F_1 short or almost equally long than F_2 . Almost all Cynipini and most Figitidae have F_1 equally or weakly longer F_1 than F_2 , while almost all Synergini, the remaining cynipid tribes and few Figitidae have F_1 clearly longer than F_2 (Fig. 2, Table 2). It seems thus that there is certain phylogenetic effect on such patterns.

Most of the studied species have the F_n 1.8-2.5 longer than wide (character 3: Fig. 2, Table 2), with narrower or thicker F_n present in less than half of the species. The three states are apparently randomly distributed within lineages.

Sensilla found on the antennae of male Cynipoidea protrude from the cuticle or sometimes lie within or beneath it. Overall, we recognized eight types of sensilla: sensilla placodea (SP), sensilla coeloconica type A (SCo-A), sensilla campaniformia (SCa), sensilla basiconica (SB), and four types of sensilla trichoidea (ST-A, ST-B, ST-C, ST-D). Not all types, however, were found on all species (range: 5-8) (Table 2).

The hierarchical cluster analysis based on the presence/absence of the different types of sensilla reveals that neither the phylogenetic relationships among species nor life-history traits have any strong relationship with occurrence of sensillar types (Table 2, Fig. 3).

The SP are the largest and the most conspicuous sensilla type on the antennae of all species (Fig. 4). They are elongated pore-plate structures developing along the longitudinal axis of the flagellomeres. We found differences in several characters among species. First, most species have SP present only apically or covering the entire F_1 (Table 2, Fig. 4), with few species lacking SP in F_1 . On the other hand, almost all species have SP on F_2 , F_2 and F_4 . Second, most species have SP arranged in one or two rows, very rarely in three rows (mostly in Cynipidae) and in >3 rows only in Ibalidae (Table 2, Fig. 4). Number of SP visible in each row was more often 6-8 or 8-12 (Fig. 4). Most of the analysed species have SP in a row widely or narrowly

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

separated, while few cases of closely spaced, almost contiguous SP in a row occurred, e.g. in Ibalidae and *Callaspidia* (Figitidae) (Table 2, Fig. 4).

The shape of SP almost flat, slightly or not rising on the segment, in most of species, with only 7 cases having ridge-like SP, clearly raising on the segment; these latter cases belong mostly to Figitidae (Table 2, Fig. 5). SP do not reach the distal margin of segment only in *Rhoophilus loewi*, while in most species SP reach the distal margin of segment or more or less overlap with the distal margin of segment. About half of species have linear SP with parallel margins, while the other half have more or less sinuate SP (Table 2, Fig. 5).

The relative length of setae on F_n (before last three) (relative to width of flagellomere) was very short in about half of species, while in the other species is either medium sized or large (with similar frequencies) (Table 2, Fig. 5).

Sensilla coeloconica type A (SCo-A) (poreless sensilla composed of a cuticular peg and a “collar” of cuticle surrounding the peg) is generally absent in F_A ; 15 species has SCo-A present in F_A . In most species, F_A bears 1 SCo-A, while several species have 2 SCo-A and just one species (*Timaspis phoenixopodos*) has 3 SCo-A in F_A (Table 2, Fig. 6). SCo-A is located on or close the distal margin of a flagellomere in most species, with some having SCo-A far from the distal margin. The relative size of the pit of a SCo-A (compared with width of penultimate flagellomere) is either small, medium size or large in similar frequencies. Medium size SCo-A were found most often in herb-gallers, while large SCo-A were found most often in parasitoids (Table 2, Fig. 6). The maximum number of SCo-A found on a flagellomere was 1 in most species, while several species have 2 SCo-A and just *Plectocynips pilosus* has 3 SCo-A. SCo-A were either flat or slightly raising in similar frequencies (Table 2, Fig. 6).

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

Table 2. Data matrix based on the characters listed in the Materials and methods. “–” was used to denote a character that is not applicable to that species, and “?” was used to denote uncertain assignation to a character state.

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
<i>Acanthaegilips</i> sp.	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	0	1	1	0	0	-	1	-	0	-	-	-	-	0	0	1	0	1	0	-	-	3	1	1	
<i>Alloxysta</i> sp.	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0	-	1	1	0	2	1	1	1	
<i>Anacharis</i> sp.	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	-	1	-	0	-	-	-	-	0	0	0	-	1	1	1	0	3	1	1	
<i>Andricus grossulariae</i>	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	2	0	1	0	-	0	-	0	0	0	-	-	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
<i>Andricus quercusradicis</i>	2	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0	2	0	2	0	-	0	-	0	0	0	-	-	0	1	0	-	1	1	0	2	1	1	0	
<i>Antistrophus silphii</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	-	1	-	1	0	1	0	-	0	1	1	0	1	0	1	-	2	1	0	
<i>Aulacidea hieracii</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	-	-	1	-	1	0	1	1	1	0	2	1	0	
<i>Barbotinia oraniensis</i>	2	0	1	2	1	1	1	1	2	1	0	1	1	2	0	-	0	-	0	0	0	-	-	0	2	0	-	1	1	1	1	2	1	0	
<i>Biorhiza pallida</i>	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	0	2	1	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	1	1	0	2	2	1	1	
<i>Callaspidia notata</i>	1	1	1	2	1	1	1	2	3	2	0	2	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	9	0	1	1	0	1	0	-	-	1	1	1	
<i>Callirhytis cameroni</i>	2	1	1	2	1	1	1	0	2	0	0	1	0	1	0	-	0	-	0	0	0	-	-	1	-	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
<i>Cecinothofagus ibarraei</i>	2	1	0	2	1	1	1	0	2	1	0	1	1	0	1	0	-	0	-	0	1	1	11	1	-	0	-	1	1	0	1	1	1	1	
<i>Ceroptres</i> sp.	2	0	0	2	1	1	1	0	2	0	0	2	0	1	0	-	0	-	0	0	0	1	9	0	0	0	-	1	1	1	0	1	1	1	
<i>Diplolepis mayri</i>	0	2	1	2	1	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	10	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	
<i>Eschatocerus acaciae</i>	0	0	2	0	1	1	1	2	2	2	0	1	1	0	?	?	1	2	1	0	1	0	?	0	0	1	3	1	0	-	-	0	1	0	
<i>Figites</i> sp.	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

<i>Hedickiana levantina</i>	1	0	1	2	1	1	1	1	2	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	10	1	-	0	-	1	0	-	-	3	1	1	
<i>Hexacola</i> sp.	2	2	2	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	2	0	-	1	-	0	1	0	1	9	0	0	0	-	1	1	0	2	1	1	0
<i>Ibalia leucospoides</i>	2	0	2	0	1	1	1	3	3	2	0	2	1	1	1	-	1	2	1	0	1	1	8	0	2	0	-	1	1	1	2	3	1	0
<i>Iraella luteipes</i>	2	0	2	2	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	7	1	-	0	-	1	1	0	1	2	1	0	
<i>Isocolus lichtensteini</i>	1	0	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	-	0	0	0	-	-	1	-	1	0	1	1	1	1	2	1	1
<i>Lithonecrus papuanus</i>	2	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0	-	0	-	0	1	0	1	8	0	2	1	2	1	1	0	0	1	1	0
<i>Lonchidia</i> sp.	1	1	2	2	1	1	1	0	0	0	1	2	0	2	0	-	0	-	0	-	-	-	0	0	0	-	1	1	0	2	1	1	0	
<i>Melanips</i> sp.	1	2	0	2	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	?	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	1
<i>Neaylax verbenacus</i>	1	0	0	2	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	8	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
<i>Neralsia</i> sp.	1	0	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	0	0	2	0	0	0	1	?	0	0	0	-	1	1	0	2	1	1	0	
<i>Panteliella fedtschenkoi</i>	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	-	1	-	0	0	0	-	-	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1
<i>Parnips nigripes</i>	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	0	2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	7	1	-	0	-	1	1	0	1	2	1	0
<i>Pediaspis aceris</i>	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	0	1	0	1	0	-	0	-	1	1	1	0	?	1	-	0	-	1	1	0	1	2	1	0
<i>Periclistus brandtii</i>	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	-	0	-	0	0	0	1	7	0	2	1	0	1	1	1	0	1	1	1
<i>Phanacis centaureae</i>	1	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	7	0	2	0	-	1	1	0	0	1	1	0
<i>Plagiotrochus australis</i>	2	1	2	2	1	1	1	1	1	0	0	2	1	2	0	-	0	-	0	1	0	1	10	0	0	0	-	1	1	0	2	1	1	0
<i>Plectocynips pilosus</i>	3	0	0	2	1	1	1	0	2	1	1	2	0	2	0	-	1	-	2	1	1	1	11	0	0	0	-	1	1	0	1	1	1	0
<i>Pseudoneuroterus saliens</i>	2	1	1	2	1	1	1	0	2	0	0	2	0	2	0	-	0	-	0	1	0	1	10	0	0	1	0	1	1	0	2	1	1	1
<i>Rhoophilus loewi</i>	1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	-	0	-	0	1	1	0	9	0	0	0	-	1	1	0	0	1	1	0

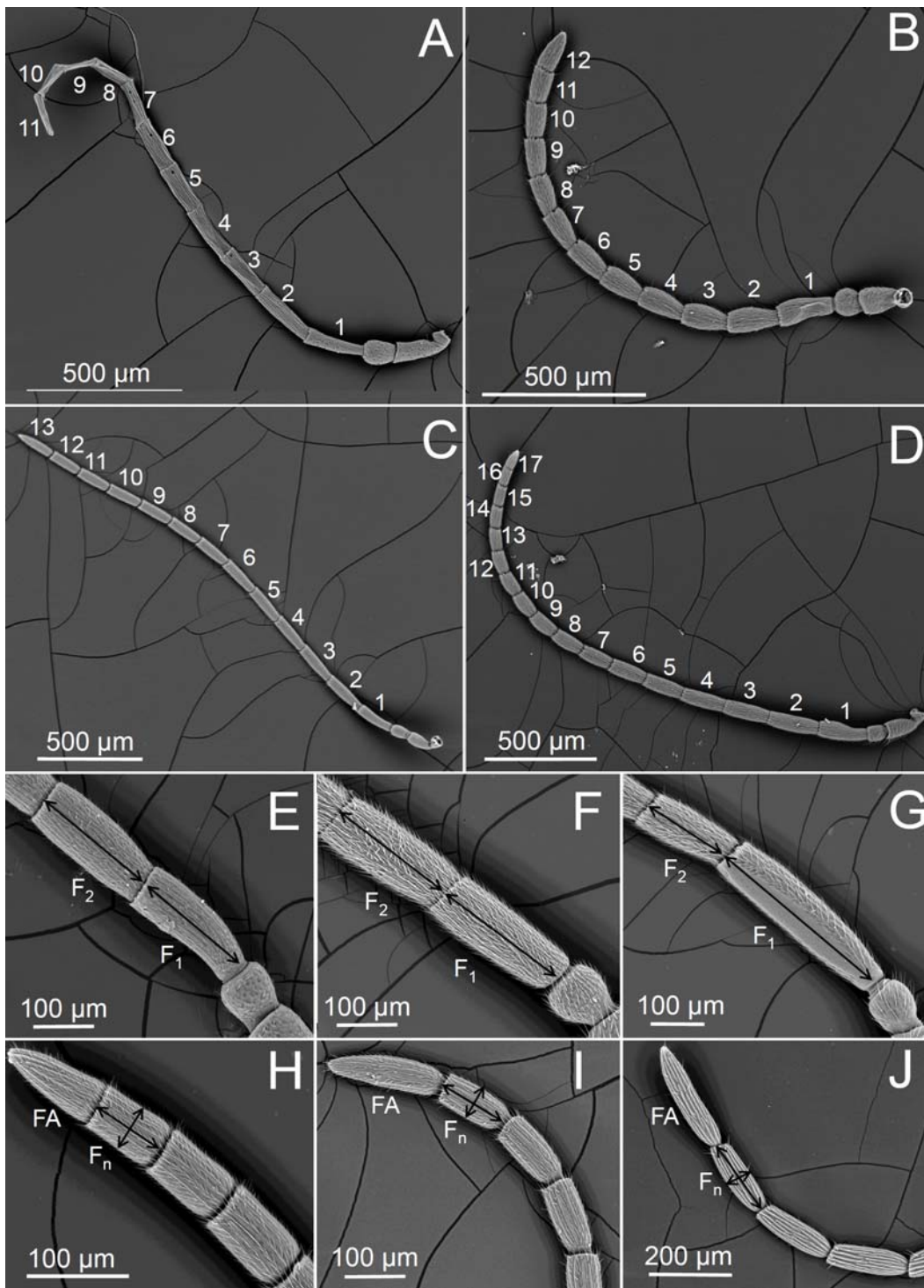


Figure 2. Variability in the general aspect of the antennae of male Cynipoidea. A) *Eschatocerus acaciae*, B) *Andricus grossulareae*, C) *Iraella luteipes*, D) *Plectocynips pilosus*, E) *Hedickiana levantina*, F) *Parnips nigripes*, G) *Diplolepis mayri*, H) *Saphonecrus lusitanicus*, I) *Xestophanes potentillae*, J) *Figites* sp.. A-D show variability in number of flagellomeres, E-F show variability in the length ratio of F₁ over F₂, and H-J show variability in the length/width ratio of F_n.

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

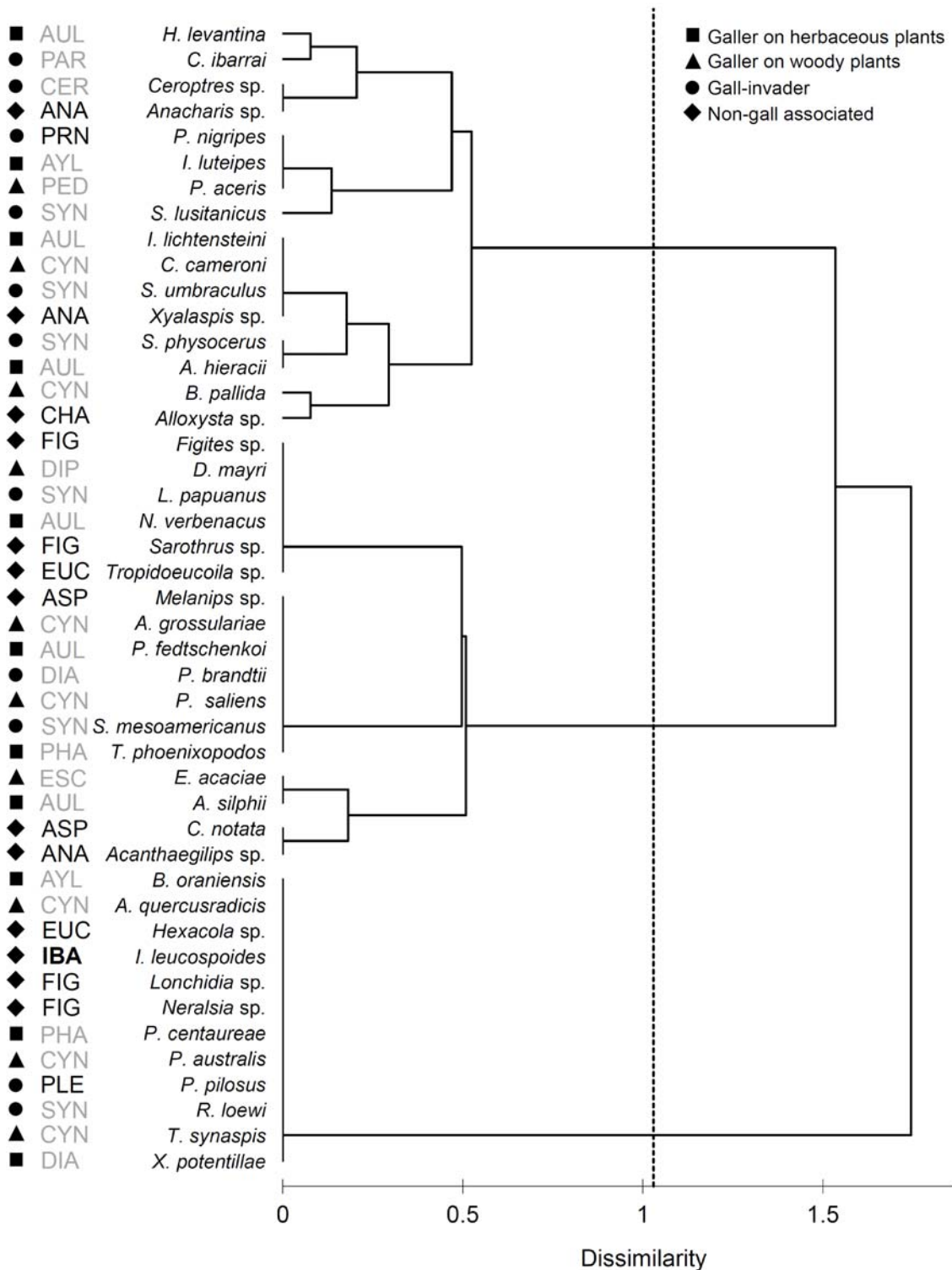


Figure 3. Dendrogram depicted by the Hierarchical Cluster Analysis (Bray and Curtis distance) based on the matrix of presence/absence of the eighth different types of sensilla for males of each species. The dashed line represents the most probable truncation that segregates different clusters. The life-history for each species is mapped on the dendrogram, as well as the taxonomic position of each species (in grey, Cynipidae; in black, Figitidae; in bold black, Ibalidae). Abbreviations: AUL = Aulacideini, AYL = Aylacini, PAR = Paraulacini, CER= Ceroptresini, CYN = Cynipini, SYN = Synergini, ESC = Escathocerini, DIA = Diastrophini, PHA = Phanacidini, DIP = Diplolepidini, PED = Pediastpidini, ANA = Anacharitinae, ASP = Aspicerinae, FIG = Figitinae, PLE = Plectocynipinae, CHA = Charipinae, EUC = Eucoilinae, PRN = Parnipinae, IBA = Ibalidae.

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

The bulb of a SCo-A was often sunken, not reaching margin, but many cases of SCo-A reaching margin or slightly raising from the margins were found (Table 2, Fig. 7). The shape of the bulb of SCo-A was blunt apically in most species, while in only 4 species it was pointed apically (Table 2, Fig. 7). The number of visible segments on the SCo-A bulb vary considerably and it was more often 9-10 (Table 2, Fig. 7). Only one species (*Timaspis phoenixopodos*) has 6 segments and only two (*Cecinothofagus ibarra* and *Plectocynips pilosus*) has 11 segments.

Sensilla campaniformia (SCa) (button-like knobs emerging from a cuticular disk) were absent in most species, while it was present 14 species. The shape of SCa is more often convex, though 6 cases of flat SCa and 7 cases of concavous SCa were also recorded (Table 2, Fig. 7).

Sensilla basiconica (SB) (hair-like structures with by a grooved surface and a porous thick peg) were present or absent in similar frequencies in the studies species. SB occurs as single sensillum or in very few number on the flagellum in most of species; in some species several SB occur not arranged in rows, while only in 1 species (*Lithonecrus papuanus*) SB are arranged in two rows of erect sensilla on distal flagellomeres and in 1 species (*Eschatocerus acaciae*) SB are arranged as a crown on the apical part of last flagellomere (Table 2, Fig. 8).

Sensilla trichoidea (hair-like structures of different shape and length) are present in four sub-types. ST-A (generally not perpendicular to the antennal axis and with finely grooved surface) occur in all species.

ST-B (the longest sensilla trichoidea, almost perpendicular to the antennal axis) occur in almost all species, most often only on distal part of flagellomeres (Table 2, Fig. 9). ST (A or B) length (relative to width of a flagellomere) was either short, medium sized or long in similar frequencies (Table 2, Fig. 9).

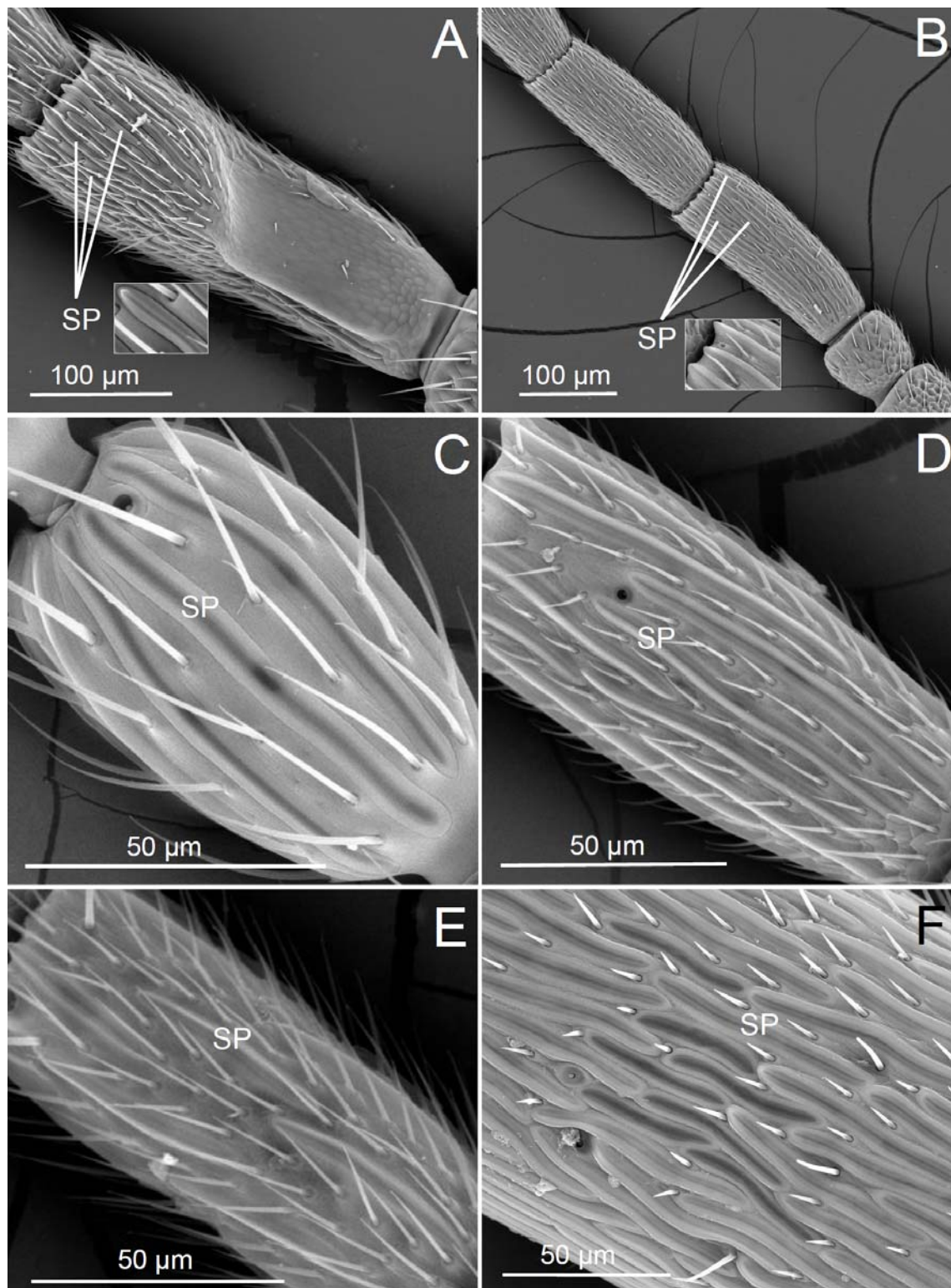


Figure 4. Variability in morphology and arrangement of sensilla placoidea (SP) in the antennae of male Cynipoidea. A) *Biorhiza pallida*, B) *Barbotinia oraniensis*, C) *Tropidoeucoila* sp., D) *Neaylax verbenacus*, E) *Pediaspis aceris*, F) *Ibalia leucospoides*. A-B show variability in relative extension of the SP, C-D show variability in the number of SP rows and number of SP per row, and E-F show the variability in the shape of SP.

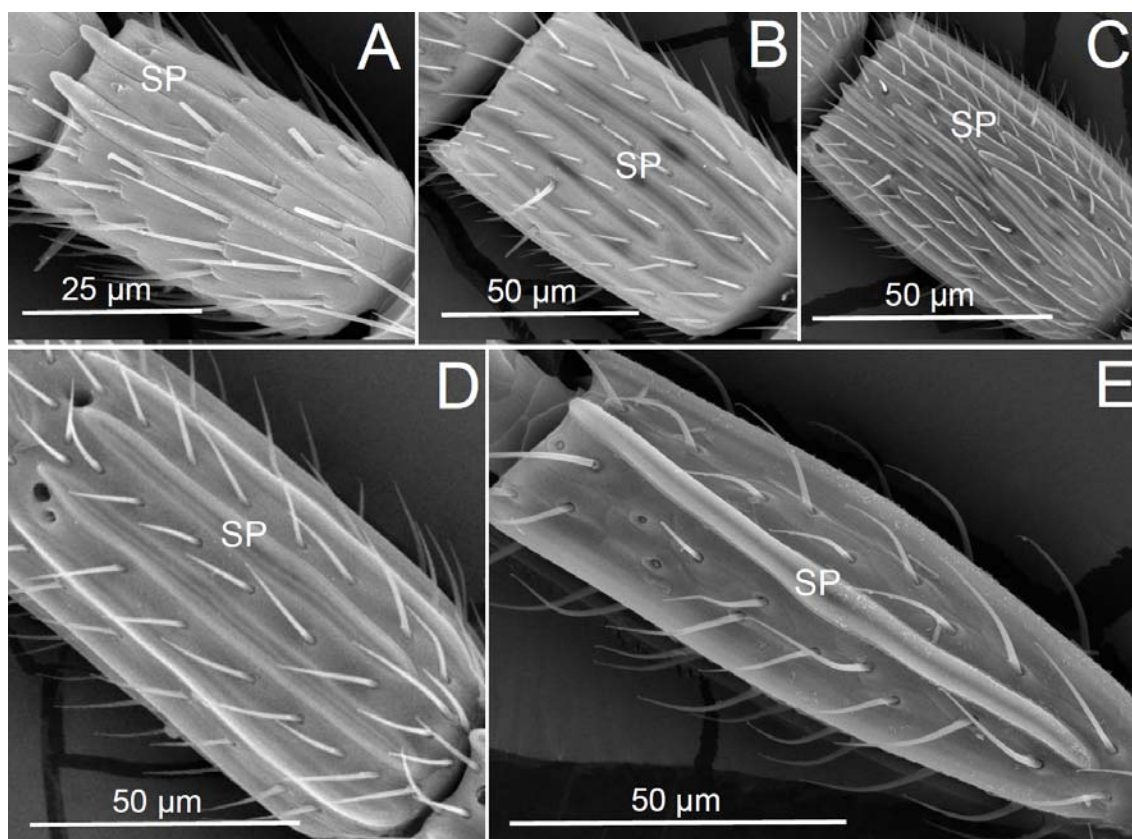


Figure 5. Variability in morphology and arrangement of sensilla placoidea (SP) in the antennae of male Cynipoidea. A) *Lithonecrus papuanus*, B) *Rhoophilus loewi*, C) *Melanips* sp., D) *Timaspis phoenixopodos*, E) *Lonchidia* sp.. A-E show variability in relative extension of the SP, in the number of SP rows and in the number of SP per row.

There is few (1-2) ST of A-B types on F_n only in *Eschatocerus acaciae*, while most species have from 4 to 15) ST; very dense ST (>15) are found in 4 species (2 Figitidae, Iballiidae and the cynipid *Hedickiana levantina*) (Table 2, Fig. 9).

ST-C (not very thick, strongly inclined, and almost laying on the antennal surface) are always present on the antennae (Table 2, Fig. 9).

ST-D (short hair-like sensilla, bulbous at the base) occurred in about half of the studied species (Table 2, Fig. 9).

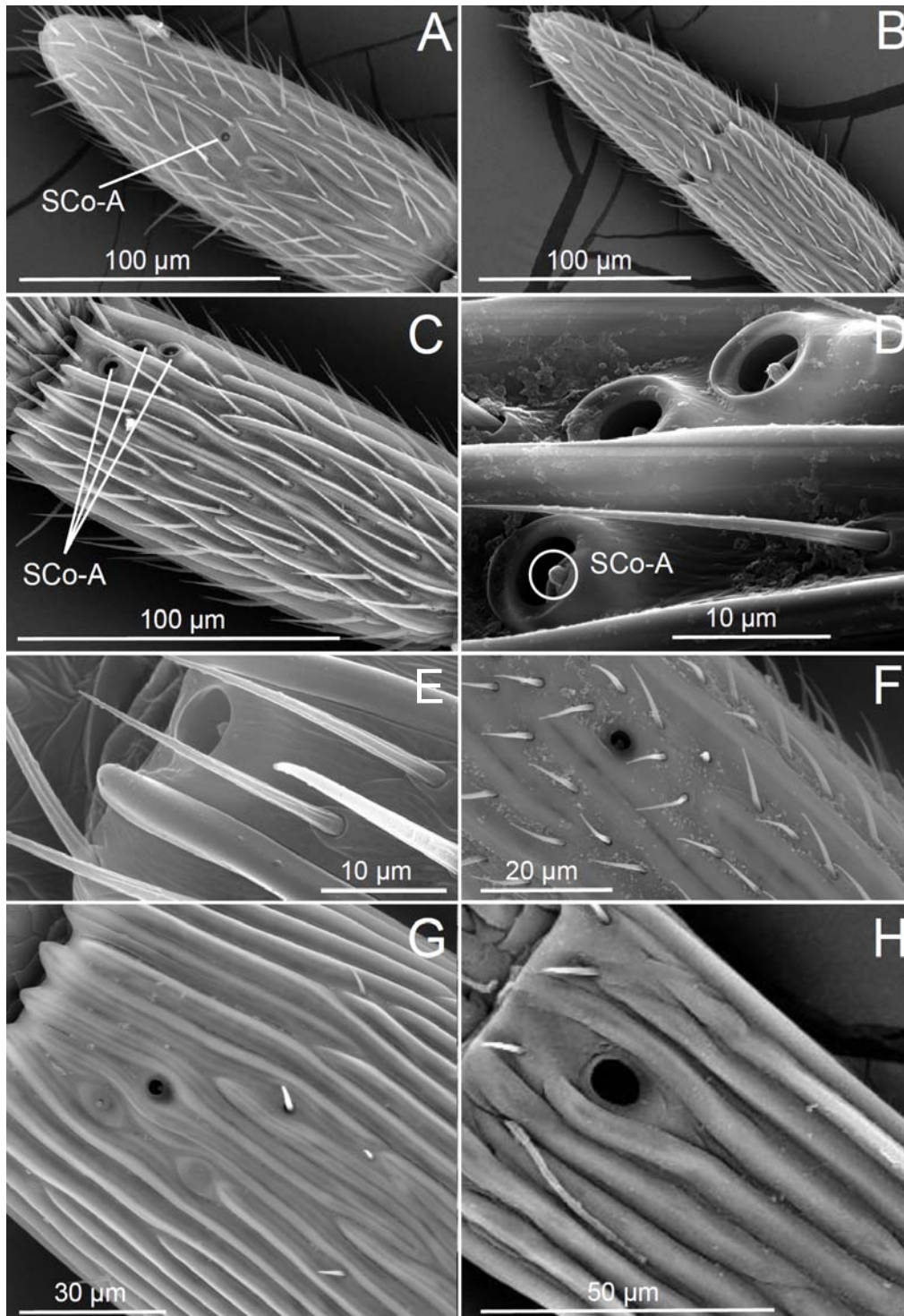


Figure 6. Variability in morphology and arrangement of sensilla coeloconica (SCo-A) in the antennae of male Cynipoidea. A) *Diplolepis mayri*, B) *Aulacidea hieracii*, C) *Plectocynips pilosus*, D) *Plectocynips pilosus*, E) *Plagiotrochus australis*, F) *Isocolus lichtensteini*, G) *Callaspidia notata*, H) *Eschatocerus acaciae*. A-B show variability in number of SCo-A in last flagellomere, C-D show the maximum number of SCo-A found in F_n , E-F show variability in the position of SCo-A relative to the anterior margin of F_n , and G-H show variability in the relative size of SCo-A.

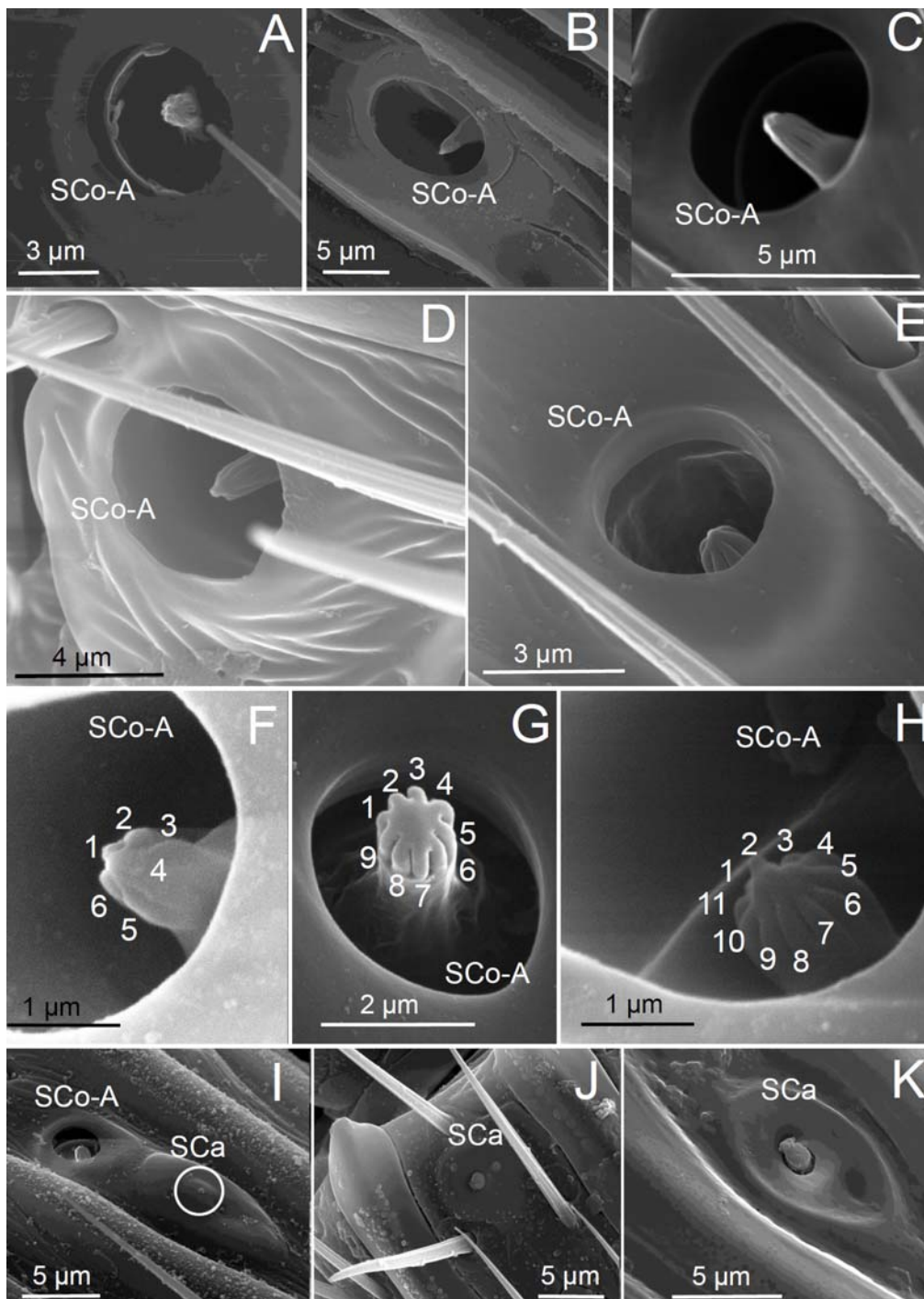


Figure 7. Variability in morphology of sensilla coeloconica (SCo-A) and sensilla campaniformia (SCa) in the antennae of male Cynipoidea. A) *Hedickiana levantina*, B) *Eschatocerus acaciae*, C) *Antistrophus silphii*, D) *Pediaspis aceris*, E) *Periclistus brandtii*, F) *Timaspis phoenixopodos*, G) *Ceroptres* sp., H) *Cecinothofagus ibarrai*, I) *Hexacola* sp., J) *Xestophanes potentillae*, K) *Ibalia leucospoides*. A-C show variability in the shape of the SCo-A bulb, D-E show variability in the degree of protruding of the SCo-A bulb, F-H show variability in the number of furrows of the SCo-A bulb, and I-K show variability in the morphology of SCa.

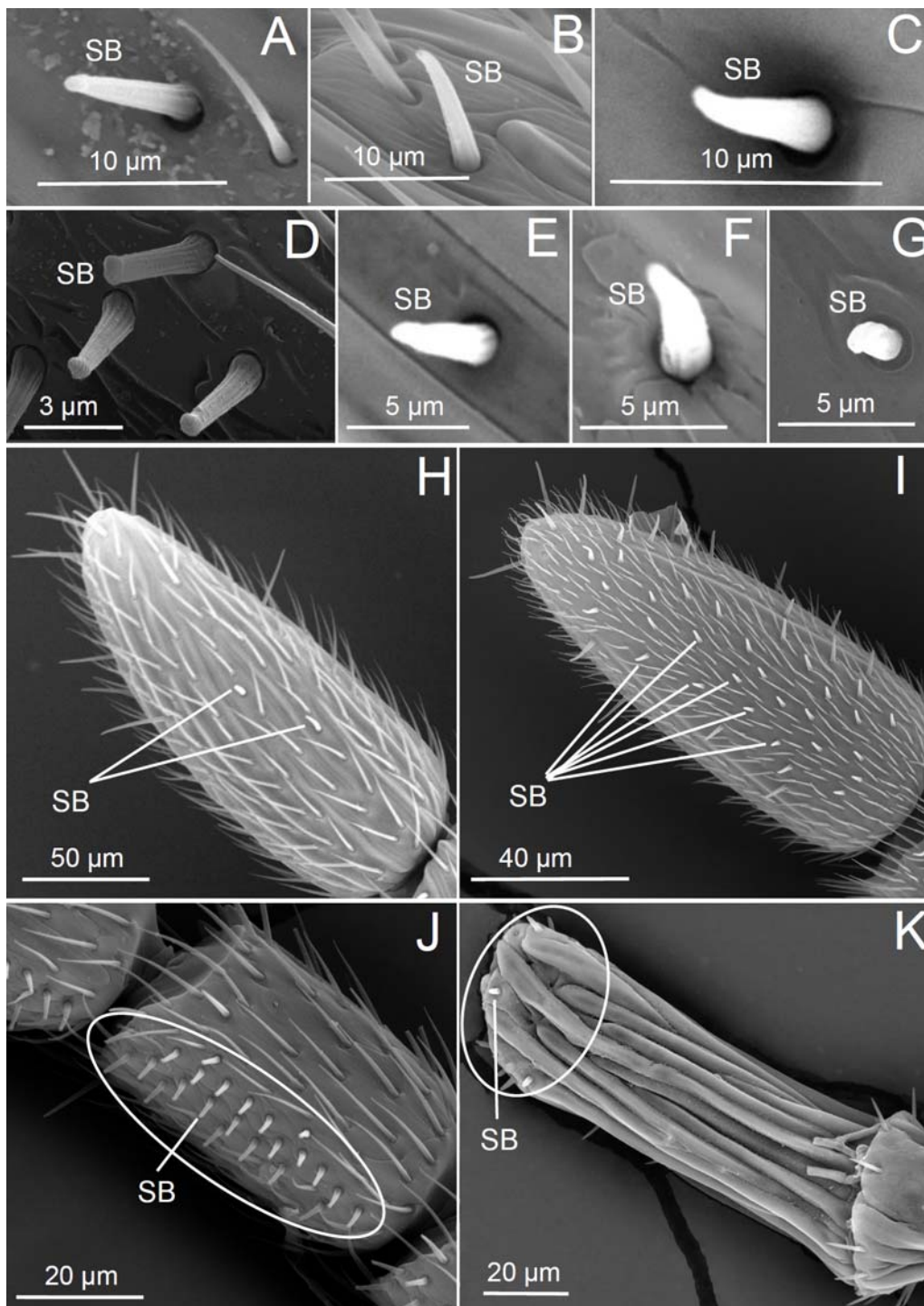


Figure 8. Variability in morphology and arrangement of sensilla basiconica (SB) in the antennae of male Cynipoidea. A) *Isocolus lichtensteini*, B) *Andricus grossulariae*, C) *Antistrophus silphii*, D) *Lithonecrus papuanus*, E) *Xyalaspis* sp., F) *Melanips* sp., G) *Ibalia leucospoides*, H) *Diplolepis mayri*, I) *Synergus umbraculus*, J) *Lithonecrus papuanus*, K) *Eschatocerus acaciae*. A-G show variability in the shape of SB, H-I show variability in the number of SB in F_n , and J-K show variability in the position of SB in F_n .

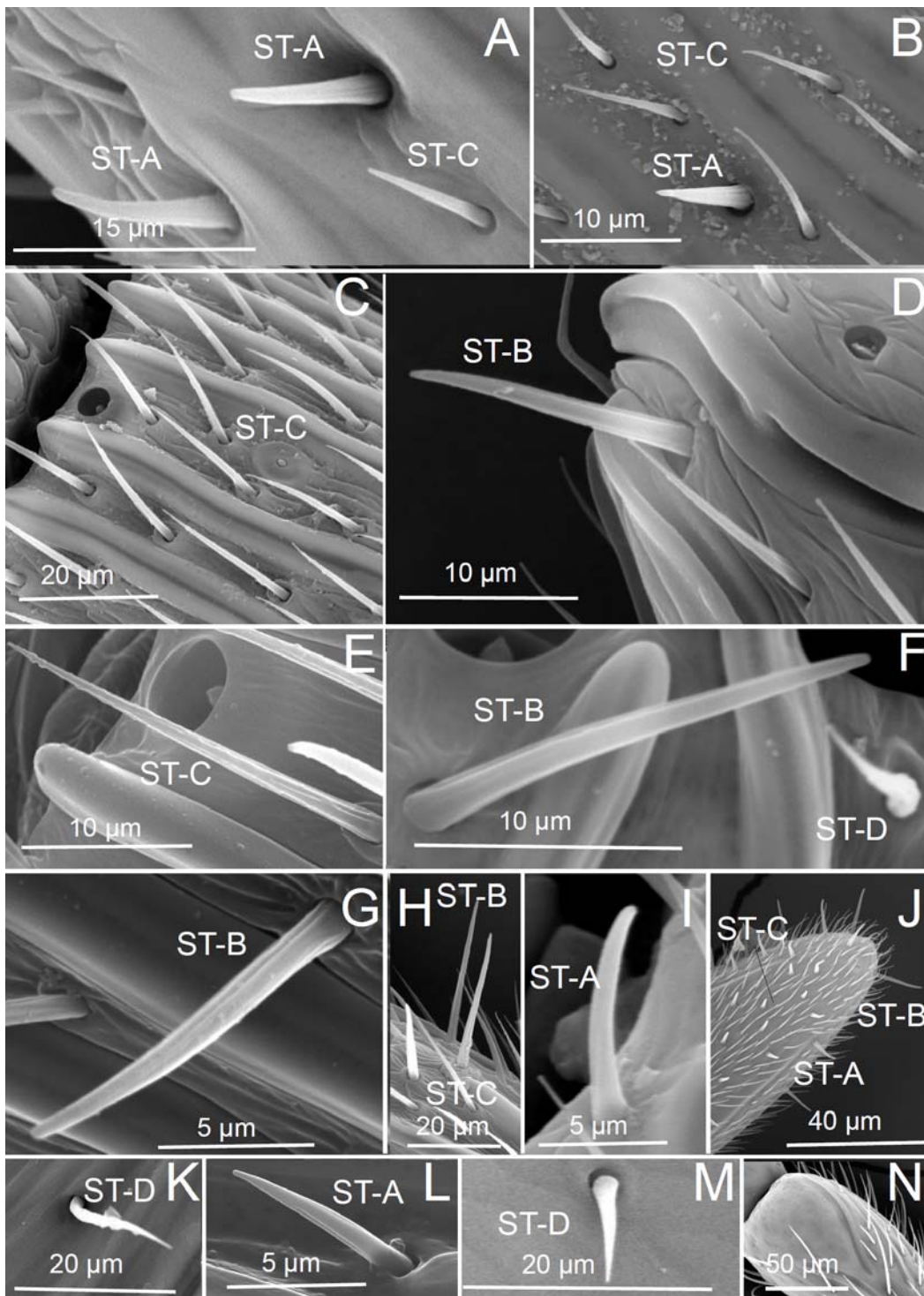


Figure 9. Variability in morphology and arrangement of sensilla trichoidea (ST-A, S_T-B, ST-C, ST-D) in the antennae of male Cynipoidea. A) *Antistrophus silphii*, B) *Isocolus lichtensteini*, C) *Barbotinia oraniensis*, D) *Andricus grossulariae*, E) *Plagiotrochus australis*, F) *Pseudoneuroterus saliens*, G) *Periclistus brandtii*, H) *Pediaspis aceris*, I) *Neaylax verbenacus*, J) *Synergus umbraculus*, K) *Acanthaegilips* sp., L) *Ibalia leucospoides*, M) *Biorhiza pallida*, N) *Cecinothofagus ibarrai*.

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

The sexual dimorphism in the number of sensillar types was very variable among lineages (Table 3, Fig. 10). It was highest in Eucoilinae and Anacharitinae (Figitidae), and lowest in Figitinae (Figitidae) and several cynipid tribes. Non-gallers tend to have higher sexual dimorphism (i.e. males have much more sensillar types than females) than gallers (ANOVA, $F = 4.81$, $df = 26$, $P = 0.038$) (Fig. 10). Thus, male Cynipoidea generally possess a lower number of sensillar types than females in gall-inducers and a greater number of sensillar types than females in non-gall-inducers. Notably, male Cynipoidea lack 4 types of sensilla found in females: sensilla coeloconica type B, sensilla trichoidea type E, “large disc sensilla” and “large volcano sensilla”. Sexes shared 40%-100% of sensillar types. The number of shared sensillar types was highest in Charipinae (Figitidae) and in Iballidae, and it was lowest in Eschatocerini (Cynipidae) and Figitinae (Figitidae) (Table 3, Fig. 10). There is no difference between gallers and non-gallers in the number of shared sensillar types (ANOVA, $F = 2.82$, $df = 26$, $P = 0.10$) (Fig. 10).

The sexual dimorphism in the number of flagellomeres was also variable (Table 2). In most lineages males have just one or two more flagellomeres than females; however, in Plectocynipinae the male/female ratio was < 1 , and in Figitinae males have much more flagellomeres than females (ratio = 1.45). There is no difference between gallers and non-gallers (ANOVA, $F = 3.59$, $df = 26$, $P = 0.07$) (Fig. 10).

The sexual dimorphism in the number of SP on the antennae ranges from 1 or a bit more than 1 (same or very similar number in males and females, e.g. in Eschatocerini and Phanacidini (Cynipidae)) to 4 or 5 (much more SP in males than in females, in Plectocynipinae (Figitidae) and Iballidae). Gallers tend to have marginally higher sexual dimorphism than non-gallers in this trait (ANOVA, $F = 4.23$, $df = 26$, $P = 0.05$) (Fig. 10).

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

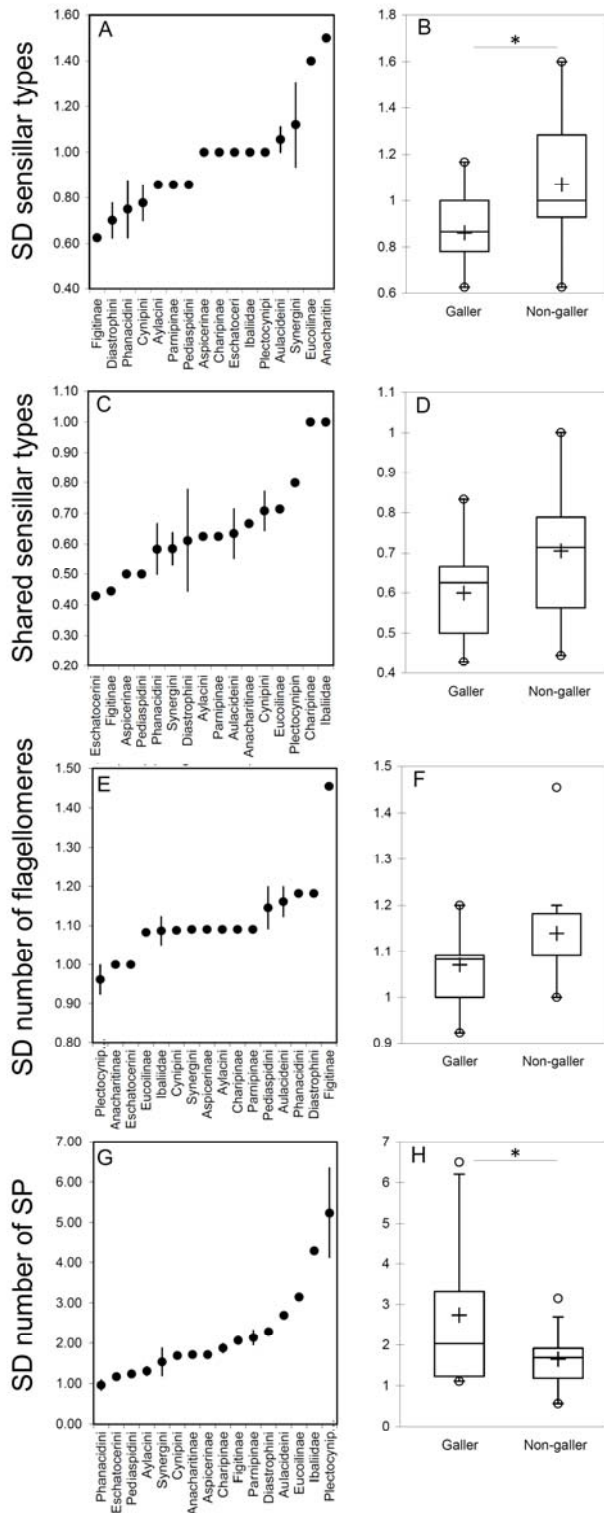


Figure 10. Sexual dimorphism (SD: males/females) in antennal morphology and sensillar equipment in Cynipoidea. Mean values are calculated across species within lineages (graphs on the left) and across species within life-history groups (box-plots on the right). A-B), number of sensillar types, C-D) number of shared sensillar types between sexes, E-F) number of flagellomeres, G-H) number of sensilla placoidea (SP). In the box-plots, + indicate mean values, horizontal lines indicate median values, and circles indicate extreme values. * = significant difference (ANOVA) between gallers and non-gallers.

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

Table 3. Data of male and female Cynipoidea used for the analysis of sexual dimorphism (SD = males/females) in antenna and antennal sensillar equipment. SP = sensilla placoidea; shared sensillar types = number of shared sensillar types between sexes/total number of sensillar types in the species.

Taxon	Gall-inducing or not	SD sensillar types	Shared sensillar types	SD number of flagellomeres	SD number of SP	Origin of data
Cynipidae: Aulacideini						
<i>Hedickiana levantina</i>	galler	1	0.5	1.2	1.11	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
<i>Isocolus lichtensteini</i>	galler	1	0.77	1.2	1.2	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
<i>Panteliella fedtschenkoi</i>	galler	1.16	0.62	1.08	1.2	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
Cynipidae: Aylacini						
<i>Iraella luteipes</i>	galler	0.85	0.62	1.08	2.06	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
Cynipidae: Cynipini						
<i>Andricus grossulariae</i>	galler	0.87	0.66	1.09	3	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
<i>Andricus quercusradicis</i>	galler	0.62	0.62	1.09	6.5	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
<i>Trigonaspis synaspis</i>	galler	0.83	0.83	1.08	6.20	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
Cynipidae: Diastrophini						
<i>Periclistus brandtii</i>	non-galler	0.77	0.77	1.2	1.94	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
<i>Xestophanes potentillae</i>	galler	0.62	0.44	1.09	2.33	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
Cynipidae: Eschatocerini						
<i>Eschatocerus acaciae</i>	galler	1	0.42	1	4.28	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

Cynipidae: Pediaspidini

<i>Pediaspis aceris</i>	galler	0.85	0.5	1	1.23	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
-------------------------	--------	------	-----	---	------	---------------------------------------------

Cynipidae: Phanacidini

<i>Phanacis centaureae</i>	galler	0.62	0.5	1	2	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
----------------------------	--------	------	-----	---	---	---------------------------------------------

<i>Timaspis phoenixopodos</i>	galler	0.87	0.66	0.92	1.75	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
-------------------------------	--------	------	------	------	------	---------------------------------------------

Cynipidae: Synergini

<i>Rhoophilus loewi</i>	non-galler	0.71	0.5	1	1	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
-------------------------	------------	------	-----	---	---	---------------------------------------------

<i>Saphonecrus lusitanicus</i>	non-galler	1	0.71	1.18	1.2	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
--------------------------------	------------	---	------	------	-----	---------------------------------------------

<i>Synergus physocerus</i>	non-galler	1.1	0.62	1.08	0.56	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
----------------------------	------------	-----	------	------	------	---------------------------------------------

<i>Synergus umbraculus</i>	non-galler	1.6	0.5	1.08	1.09	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
----------------------------	------------	-----	-----	------	------	---------------------------------------------

Figitidae: Anacharitinae

<i>Acanthaegilips</i> sp.	non-galler	1.5	0.66	1.09	1.71	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
---------------------------	------------	-----	------	------	------	---------------------------------------------

Figitidae: Aspicerinae

<i>Callaspidia notata</i>	non-galler	1	0.5	1.09	3.15	This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)
---------------------------	------------	---	-----	------	------	---------------------------------------------

Figitidae: Charipinae

<i>Alloxysta consobrina</i>	non-galler	1	1	1.09	1.18	Polidori et al. (2016)
-----------------------------	------------	---	---	------	------	------------------------

<i>Alloxysta victrix</i>	non-galler	1	1	1.09	1.43	Polidori et al. (2016)
--------------------------	------------	---	---	------	------	------------------------

Figitidae: Eucoilinae

<i>Aganaspis daci</i>	non-galler	1.4	0.71	1.18	1.89	Tormos et al. (2013)
-----------------------	------------	-----	------	------	------	----------------------

<i>Aganaspis pelleranoi</i>	non-galler	1.4	0.71	1.18	1.18	Tormos et al. (2013)
-----------------------------	------------	-----	------	------	------	----------------------

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

Figitidae: Figitinae

Neralsia sp. non-galler 0.62 0.44 1.09 1.71 This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)

Figitidae: Parnipinae

Parnips nigripes non-galler 0.85 0.62 1.09 1.68 This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)

Figitidae: Plectocynipinae

Plectocynips pilosus non-galler 1 0.8 1.45 2.28 This study; Polidori & Nieves-Aldrey (2014)

Ibaliidae

Ibalia leucospoides ensiger non-galler 1 1 1.18 2.69 Robertson & Gandhi (2018)

5.5.6. Discussion

The present study characterized for the first time the antennal sensillar equipment and the antennal morphology of males Cynipoidea in a large comparative framework, as well as the first attempt to evidence some possible evolutionary trends in sexual dimorphism in this trait in the superfamily. Male Cynipoidea were previously neglected in morphological studies on sensory systems. As far as we know, antennae were analysed in detail only in two species of *Aganaspis* and two species of *Alloxysta*, both genera of Figitidae (Tormos et al. 2013; Polidori et al. 2016). Recently, a species of Ibalidae was also studied in detail (Robertson & Gandhi 2018).

On the whole, our results reveal, first of all, that the sensillar equipment on the antennae of male Cynipoidea closely resemble that of females, in that the sensillar types found in males have very similar morphologies to those found in females (Polidori & Nieves-Aldrey 2014). Thus, SP, SB, SCo-A, SCa and four sub-types of ST have the same external morphology in males and females. However, females are exclusive in possessing four types of sensilla that we did not found in males. These types (SCo-B, ST-E, LDS and LVS) are perhaps only present in females because their function is linked to activities that males do not perform, e.g. host plant recognition.

Differences were found in the number of sensillar types across species both in males and in females (Polidori & Nieves-Aldrey 2014). Furthermore, sexual dimorphism in this trait varies across lineages. In particular, five lineages of non-gallers (4 parasitoids within Figitidae and the inquiline Syniengini (Cynipidae) have sex dimorphism value > 1 , i.e. males have more sensillar types than females, while the lowest sexual dimorphism value (< 0.8) were found in Figitinae and 3 galler cynipid lineages. In turn, on average non-galler present greater sexual dimorphism than gallers. This suggests, at least preliminarily, that female gallers have a richer sensillar equipment possibly

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

related to activity related with host plant finding and/or recognition. Alternatively, males of non-gallers are equipped with additional sensillar types involved in courtship and/or mating behaviour. The latter situation was found in other “Terebrantia”. For example, in *Trichogramma australicum* (Girault) (Chalcidoidea: Trichogrammatidae), male antennae possess two types of ST not found in females, perhaps because they are related with courtship behavior (Amornsak et al. 1998). As a consequence, males and females of a given species very rarely shared the same sensillar types (2 out of 27 analysed species in our study). However, we did not find any suggestion that this variability may be linked with life-history (at least the considered dichotomy of gallers vs. non-gallers). In any case, the fact that some lineages, e.g. Figitinae, Eschatocerini, have $\leq 50\%$ of shared sensillar types suggest that other biological traits – not taken into account here – may have shaped differentially male and female sensory system in some cynipoid groups.

The overall morphology of antennae themselves are very similar between males and females of Cynipoidea, although males only have filiform antennae, while some female cynipidoids (Paraulacini and Plectocynipinae) have clavate antennae, i.e. i.e., the flagellomeres become suddenly wider towards the tip of the antenna, and very few figitids show a flagellum of the moniliform subtype, i.e. with round segments making the antenna like a string of beads (Polidori & Nieves-Aldrey 2014). Differences, however, appeared in the number of flagellomeres in males (as well as in females (Polidori & Nieves-Aldrey 2014)), with variability in sexual dimorphism in this trait. This variability is generally low (most lineages have males with 1-1.10 times the number of flagellomeres than females), but notably in Figitinae males have about 1.5 more flagellomeres than females. No suggestions can be made with the present data about why this subfamily of parasitoids is so peculiar in this trait.

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

The sensilla placodea (SP) are widespread sensilla across the apocritan Hymenoptera. The function of this sensillar type is olfactory, given their multiple cuticular pore system and results from electro-physiological research in parasitoids (Ochieng et al. 2000). While in female Cynipoidea they are likely use in host plant or host animal detection, in male Cynipoidea they could be involved in guidance to females during the mating period. The morphology of SP varies across superfamilies of Apocrita. In certain groups, such as Proctotrupomorpha (thus including Cynipoidea) and Ichneumonoidea, they are fewer, larger, and more elongated than in the the Aculeata (bees, ants and stinging wasps), where they are very numerous, of a smaller size and of a more circular shape (Polidori et al. 2012; Basibuyuk & Quicke 1999).

In both male and female Cynipoidea, SP are elongate and abundant along the antennae, and their shape differ in some aspects from that of the SP of other parasitic Hymenoptera. Indeed, in some Chalcidoidea, SP are ridge-like with apices free and extending beyond apex of segment (Gibson 1986) and, in Ichneumonoidea, SP are slightly flatter than in Cynipoidea (Bourdais et al. 2006; Obonyo et al. 2011; Ahmed et al. 2013). Among the other Proctotrupomorpha, Pelecinidae (Proctotrupeoidea) have possibly the most similar SP to those of Cynipoidea (Basibuyuk & Quicke 1999). On other hand, SP have a different shape in Platygastroidea, where they are large, sharply bent anteriorly just above the base and acutely pointed at the tip (Da Rocha et al. 2007). This morphology resembles more the SP in Chalcidoidea and in *Acanthaegilips*, although they are not embedded in the antenna as in the SP of all the other Cynipoidea. Thus, overall, Cynipoidea seem to share more similarities in SP morphology with Ichneumonoidea than with the phylogenetically closer Chalcidoidea. Cynipoidea are also characterized by having, in some species, more than one row of SP per flagellomere, a feature not share by any other group within the (Proctotrupomorpha + Ichneumonoidea) clade. Furthermore, the number of SP per row

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

seems to be higher in most Cynipoidea compared with other Proctotrupomorpha and Ichneumonoidea (Armonsak et al. 1998; Bourdais et al. 2006; Obonyo et al. 2011; Xi et al. 2011).

Differences appeared in the number of SP across species both in males and in females (Polidori & Nieves-Aldrey 2014), and the variability in sexual dimorphism in this trait is conspicuous. In particular, males have never a less number of SP than females, and can have up to 5 times the number of SP than females. We have found that the three greatest values in male/female ratio of SP number belong to parasitoid lineages, and overall non-gallers have higher sexual dimorphism than gallers in this trait. Thus, gallers may need proportionally more SP for, e.g. find host plants. In parasitoid “Terebrantia”, there are however both cases of males having more SP than females and cases of females having more SP than males. For example, in two species of *Cotesia* and in *Microplitis croceipes* Cresson (Ichneumonoidea: Braconidae), males have a greater abundance of SP compared with females (Ochieng et al. 2000; Bleeker et al. 2004), while in *Trichospilus pupivorus* (Ferriere, 1930) (Chalcidoidea: Eulophidae), *Pteromalus cerealellae* (Ashmead) (Chalcidoidea: Pteromalidae) and *Tamarixia radiata* (Waterston) (Chalcidoidea: Eulophidae) are females those having more SP than males (Onagbola and Fadamiro 2008; Onagbola et al. 2009; Moreira da Silva et al. 2016). The range of hosts as well as specialization towards host with certain biology (e.g. concealed vs. unconcealed) may be at least partially responsible for this variation. For example, SP were found to be more abundant in specialist braconids compared with generalist braconids (Das et al. 2011). New data on a larger number of species within Hymenoptera is necessary to test for the hypothesis that host use influenced the evolution of SP number on the antennae.

Sensilla coeloconica type A (SCo-A) are clearly visible sensilla on Cynipoid antennae, but they are generally in few number, mostly one per flagellomere; their

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

morphology is very similar across species in Cynipoidea, though some differences can be found in details such as the number of furrows on the peg and the relative size of the pit. In female Cynipoidea, it was suggested that the relative size of the pit increased in Cynipidae. Indeed, *Ibalia* and Figitidae has very small SCo-A, while in Cynipidae, the basal clades have a little larger pit but then become larger in Eschatocerini and in the more derived Cynipini (Polidori & Nieves-Aldrey 2014). Our results show that this trend does not seem to be present in males. For example, *Ibalia* males as well as some figitid males have large pits (state 2 of character 18). Based on electrophysiological investigations, SCo-A have a thermo-hygroreceptive function in Hymenoptera (Lacher 1964).

SCo-A of Cynipoidea are homologous to the “pit organs”, in particular in Aculeata (e.g. Polidori et al. 2012; Galvani et al. 2017). The general morphology of SCo-A is similar among species and between sexes in Cynipoidea, and their shape resemble the SCo-A found in Braconidae (Bleeker et al. 2004; Bourdais et al. 2006; Ochieng et al. 2000) in and Chalcidoidea (Onagbola and Fadamiro 2008; Meng et al. 2012). On the other hand, SCo-A are strongly different in Platygastroidea (Zhou et al. 2013; Zacharuk 1985). The other small, circular-shaped sensilla in Cynipoidea are the sensilla campaniformia (SCa). This sensillar types was observed in many lineages of both Aculeata (e.g. Polidori et al. 2012) and “Terebrantia” (e.g. Amornsak et al. 1998), with very similar external morphology. SCa are considered to be mechanoreceptors (Zacharuk 1985) or to have a gustatory function (Ochieng et al. 2000). In addition, SCa could act as thermo-hygroreceptors (Lacher 1964; Merivee et al. 2003).

Sensilla basiconica (SB) have been described in many hymenopteran lineages (e.g. Polidori & Nieves-Aldrey 2014; Martini 1986; Xi et al. 2011; Amornsak et al. 1998), with a variety of morphologies and shapes, but always sharing a typical cone-like structure with a thick peg setting into a shallow cuticular depression. This sensillar type,

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

notably, was previously suggested to lack in the figitid subfamily Eucoilinae. Indeed, it was not found in *Aganaspis*, *Ganaspis* and *Trybliographa* (Tormos et al. 2013; Polidori & Nieves-Aldrey 2014; Butterfield and Anderson 1994). However, we have found SB in *Tropidoeucoila* male, thus rejecting this hypothesis. SB are likely involved in olfaction, given its porous peg (Van Baaren et al. 1996; Keil 1999).

Sensilla trichoidea (ST) are extremely common on the antennae of male Cynipoidea. While in males four sub-types were recognized in our study, a further sub-type (ST-E) occurs only in females (Polidori and Nieves-Aldrey 2014). Three of ST sub-types (ST-A, ST-B and ST-C) are widespread or very common in both sexes. Particularly ST-C occur in all species and are very widespread within Hymenoptera (Romani et al. 2010). When comparing the morphology of the ST found in Cynipoidea with (likely) homologous sensilla in other Hymenoptera, we could find some similarities with a number of species within other lineages of “Terebrantia”. For example, ST-A of Cynipoidea resemble the ST in *Ceratosolen solmsi marchali* Mayr (Chalcidoidea: Agaonidae) (Li et al. 2009), the “S. trichodea TP” in *Aphidius rhopalosiphii* De Stefani-Perez (Ichneumonoidea: Braconidae) (Bourdais et al. 2006) and the “ST-UP” in *Encarsia guadeloupae* Viaggiani (Chalcidoidea: Aphelinidae) (Zhou et al. 2013). On the other side, ST-B of Cynipoidea is similar to the “ST₁” and “sensilla chaetica type 1” of few Braconidae (Ichneumonoidea) (Wang et al. 2010; Obonyo et al. 2011), and the “sensillum chaeticum” and the gustatory sensillum in few Scelioninae (Platygastroidea) (Gibson et al. 2007; Romani et al. 2010). Despite detailed studies on the internal structure of the different ST sub-types is necessary to ascertain their function, at the moment the suggestion is that the long ST (as the ST-B in our study) are chemoreceptors by contact (gustatory) and the shorter ST (like our ST-A and ST-C) are mechanoreceptors (Romani et al. 2010; Butterfield A, Anderson M (1994).

Capítulo V: Dimorfismo sexual sensorial en Cynipidae

We conclude that, in Cynipoidea, males possess the same great variability of females in antennal sensory equipment, and that in neither sex the morphology, distribution and sensity of sensillar type is of great importance in taxonomic studies. A larger sample of species is required, in particular for Figitidae, which is a very rcihe and diverse family. The significant association between sexual dimorphism for a couple of traits and general ecology (galler or non-galler) may preliminarily represent a suggestion that resource type shaped sensillar equipment. However, a formal correction for phylogeny and more quantitative data are needed to clarify any evolutionary hypotheses.

Capítulo VI

Smelling the right plant: is there a link between pollen specialization and peripheral sensory system in bees?

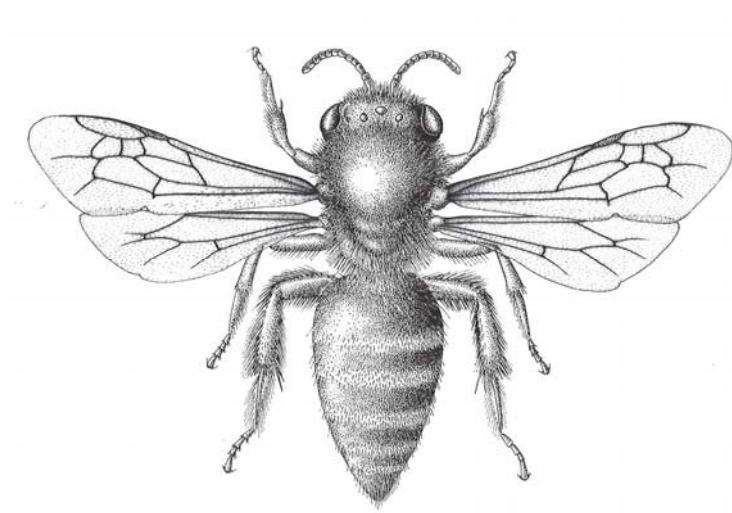
*"Nada en la vida debe ser temido,
solamente comprendido. ahora es
hora de comprender más, para temer
menos".*

Marie Skłodowska Curie



5.6.1. Resumen

Las abejas utilizan señales olfativas y visuales para encontrar las flores. Las abejas especializadas (oligolécticas) recogen polen de unas pocas especies de plantas, por lo que deben usar sustancias volátiles específicas para encontrarlas. Por otro lado, las abejas generalistas (polilécticas) no usarían volátiles específicos porque forrajean en muchas especies vegetales. El sistema sensorial de las abejas, incluido el equipo sensorial antenal, puede estar, por lo tanto, bajo selección para optimizar el reconocimiento de las plantas, y se puede esperar una variación de su morfología con la especialización. Aquí, se describe el equipo sensorial antenal de 18 especies de abejas de 6 familias, y se comprueba si la especialización se correlaciona con el número y la densidad de las principales sensilas olfativas/gustativas (placoidea (SP), basicónica (SB) y tricoidea (ST)) en el segundo flagelómero apical (el que tiene mayor abundancia y diversidad de sensilas en las abejas). Estos quimiorreceptores y otros tres tipos sensilares con función higrotérmica y perceptiva de CO₂ (sensila celocónica (SCo), sensila ampulacea (SAm), sensila coelocapitula (SCp)), tienen una morfología notablemente similar en todas las especies estudiadas. Encontramos una asociación positiva entre la anchura de la cabeza (una medida del tamaño corporal) y el número de SP, mientras que la anchura de la cabeza no se correlacionó con otros rasgos del equipo sensorial. Por otro lado, la especialización parece influir solo en la densidad de ST, con especies oligolécticas que tienen una densidad más alta que las especies polilécticas. La filogenia aparentemente no tiene efecto en estos patrones, pero una información filogenética detallada debería incorporarse en trabajos futuros, porque ambas transiciones (oligolectía a polilectía y viceversa) ocurrieron durante la evolución de las abejas. Por el momento, parece que la especialización, en cierta medida, ha tenido un papel en la modelación del sistema sensorial periférico de las abejas.



Publicación

Habitus Colletes abeillei (Pérez, 1903)

Smelling the right plant: is there a link between pollen specialization and peripheral sensory system in bees?

Alberto Jorge¹, Concepción Ornos², Carlo Polidori³

¹Laboratorio de Microscopía, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2,
E-28006, Madrid, Spain

²Departamento de Biodiversidad, Ecología y Evolución, Universidad Complutense de Madrid, C/ José
Antonio Nováis, 12, E-28040, Madrid, Spain

³Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Avenida Carlos III, s/n, E-
45071 Toledo, Spain

Artículo en preparación para su próxima publicación.

5.6.2. Abstract

Bees use olfactory as well as visual cues to find flowers. Specialized (oligolectic) bees collect pollen from few host plants, so that they should use specific volatiles to find them. On the other hand, generalist (polylectic) bees would not use specific volatiles because forage on many plants species. The sensory system, including the antennal sensillar equipment, may thus be under selection in bees to optimize plant host recognition, and a variation in its morphology with lecty may be expected. Here, we first described the antennal sensillar equipment of 18 bee species across 6 families, and then we tested if lecty correlated with numbers and density of the main olfactory/gustatory sensilla (placoidea (SP), basiconica (SB) and trichoidea (ST)) on the second apical flagellomer (the one with highest abundance and diversity of sensilla in bees). These chemoreceptors and other three sensillar types with higo-thermal and CO₂ perceptive function (sensilla coeloconica (SCo), sensilla ampullecea (SAm), sensilla coelocapitula (SCp)), had remarkable similar morphology across the studied species. We found a positive association between head width (a measure of body size) and SP number, while head width did not correlate with other sensillar traits. On the other hand, lecty seemed to influence only ST density, with oligolectic species having a higher density than polylectic species. Phylogeny apparently had no effects on these results, but detail phylogenetic information should be incorporated in future works because both trasiitions (oligolecty to polylecty and *vice-versa*) occurred during bee evolution. A the moment, it seems that plant specialization thus have had a role in shaping, to some extent, the peripheral sensory system of bees.

Keywords: antennae, Apoidea, sensilla placoidea, sensilla basiconica, sensilla trichoidea, oligolecty, polylecty.

5.6.3. Introduction

Bees (Hymenoptera: Apoidea) are important pollinators and they are the main pollen vector for a great proportion of angiosperms worldwide (Kevan & Viana 2003; Klein *et al.* 2007). Bees and angiosperms have shared a long evolutionary history and their ecological interactions are thus reflected in important behavioural, morphological and physiological adaptations (Dötterl and Vereecken 2010; Chittka and Thomson, 2004; Michener, 2007; Streinzer *et al.* 2013a). Among putative morphological and anatomical modifications as evolutionary response to their intimate relationships with plants, possibly those which were more scarcely investigated concern the sensory system (Wcislo 1995). Besides visual cues and signals (e.g. Streinzer *et al.* 2013b), female bees strongly rely on odours provided by their host plants while searching and recognizing food sources (Michener, 2007). Thus, a link between sensory system and plant use may be expected in bees.

In insects, and thus in bees also, antennae are the main sensorial appendages because they bear a diverse array of cuticle structures, named sensilla, involved in sensing mechanical, chemical, thermal and other types of environmental stimuli (Chapman, 1998). Indeed, many studies have reported that olfactory and mechanical stimuli sensed by the antennal sensilla play a central role in critical activities such as foraging, mating, recognition of natural enemies and recognition of colony nestmates in social species (Kevan and Lane, 1985; Haupt, 2007; Spaethe *et al.*, 2007; Riveros and Gronenberg, 2010). A sensillum is a structural and functional unit comprising a sensory cuticular structure and specialized sensory cells, which receive the stimuli and transmit them to the central nervous system (Chapman, 1998; Keil, 1997; Miller, 1972; Zacharuk and Shields, 1991).

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

The external morphology of antennal sensilla has been somehow investigated in species of six out of the seven families of bees (*sensu* Michener 2007), though not all with the same detail. For example, detailed studies were carried out in representative species of Andrenidae, Apidae, Halictidae and Colletidae, while sparser, reduced and qualitative data are available for Megachilidae and Melittidae (Ågren, 1989; Galvani et al., 2008; Galvani et al., 2017; Agren and Svensson, 1982; Queiroz Fialho et al. 2014). For Stenotritidae, data are even not available yet. In general, six major types of antennal sensilla are found in female Apoidea: placoidea and basiconica (olfactory function), trichoidea (olfactory or mechanoreceptory function), and coelocapitula and pit organs (ampullacea and ceoloconica) (higro-thermal and CO₂ perception) (Galvani et al., 2008; Galvani et al., 2017; Polidori et al. 2012).

Despite the general agreement in the occurrence of these types of sensilla and the overall similar morphology of sensillar types across lineages, the size, abundance and distribution in the antennae of the different sensillar types is highly variable in bees, sometimes according to their ecology. For example, Riveros and Gronenberg (2010) showed that the number of sensilla placoidea is greater in pollen and water honeybee foragers, which are known to exhibit higher sensory sensitivity, compared to nectar foragers. In bumblebees and meliponine bees sensilla patterns differ between queen and workers (Shang et al. 2010, Ravaiano et al. 2014). Parasitic forms in Apidae, Halictidae and Meliponinae seem to have lower density of sensilla placoidea than do their pollen-collecting relatives (Johnson and Howard 1987, Wcislo 1995; Galvani et al., 2017), perhaps because parasitic females may be more dependent on longer-range olfactory cues, while non-parasitic females also use visual cues and contact or short-range olfactory cues (Wcislo 1995). Among corbiculate bees (Apidae) the types and distribution of sensilla in bee antennae was suggested to be related to the degree of sociality (Queiroz Fialho et al. 2014), and in a recent study, within the

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

genus *Lasioglossum* (Halictidae), social species showed a greater density of sensilla trichoidea compared with solitary species (Wittwer et al. 2017).

Less clear is the role of plant specialization in shaping sensillar equipment of bee antennae. Wcislo (1995), based on a limited sample size of four species within Halictidae, made the only attempt to test for this hypothesis and found that closely related pairs of specialist (oligolectic: few related plant species used) and generalist (polylectic: many unrelated plants used) species did not differ in density of sensilla placoidea. However, specialist bees rely on taxon-specific olfactory cues to find their specific host plants (Dötterl and Vereecken 2010, and references therein), a peculiarity that could be reflected in some morphological-anatomical traits (Burger et al. 2010a, 2010b, 2012). This was recently explored for glomeruli in the brain in few bee species, and results showed that the oligolectic *Andrena vaga* and *Osmia adunca* have a fewer number of glomeruli in the brain compared with the polylectic *Apis mellifera* and polylectic *Osmia* species (Kelber and Rössler 2012, Burger et al. 2013). This possibly occurs because oligolectic bees might need fewer floral odours to survive. On the other hand, a neural adaptation seems to occur in *A. vaga*, since it has more sensitive glomeruli to its main host floral odorous compound, compared to honeybees (Burger et al. 2013). The possibility that also the peripheral sensory system on the antennae (sensillar equipment), i.e. the first filters to plant cues, may also be linked with plant specialization, has been not studied yet.

Here, we first give a general overview of the external morphology of the antennal sensillar equipment of 18 European bee species (nine oligolectic and nine polylectic) across six families (providing the first detailed information for many species). Then, we used quantitative data on numbers and density of the main olfactory and gustatory antennal sensilla (placoidea, basiconica and trichoidea) to test for a possible link between phenotype and plant specialization (lecty).

5.6.4. Methods

We selected 18 bee species from the European fauna, whose females were collected in recent years at various Spanish and Italian localities and preserved at the Museo de Entomología de la Universidad Complutense de Madrid (UCME) or in the private collections of Carlo Polidori (CP) and Leopoldo Castro (LC) (Table 1). The species spanned six out of the seven recognized bee families (*sensu* Michener 2007): Andrenidae, Apidae, Melittidae, Megachilidae, Halictidae and Colletidae. We selected both oligolectic and polylectic species within each family, in order to control for phylogenetic relationships in the data analysis. Thirteen of the studied species were solitary, one was communal and four were eusocial.

For most of the studied females, which come from a museum collection (UCME) or belong to rare species (LC), it was not possible to cut the antennae for the SEM observations, so that the entire pinned individuals were subjected to scanning electron microscopy without further preparation. For specimen coming from CP private collection, antennae were separated from the head and mounted on graphite stubs, and then gold-coated, prior to the SEM observations. Because certain asymmetry in antennal sensillar equipment was observed at least few bee species (Letzkus et al. 2006), we take SEM pictures only to the right antennae. Antennae were observed in the SEM both ventrally and dorsally, and pictures were mainly taken to the flagellomere 9 (F_9), i.e. the more distal one before the apical one. We concentrated the study on this flagellomere because it is known that in Apoidea it bears the largest numbers and all types of sensilla possessed by a species (e.g. Polidori et al. 2012) (Fig. 1). The head was also photographed to obtain its width (Fig. 1), which was then used in the analysis as an estimate of body size (Simmons et al. 2000, Bosch and Vicens 2002), as well as to obtain a picture of the whole antenna (Fig. 1). Three females per species were analysed.

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

SEM images were obtained using a ESEM QUANTA 200 microscope from the FEI Company (Oregon-USA) located at MNCN. For the museum specimens, we operated at low-vacuum mode (resolution: 3.0 nm at 30 kV (SE), 4.0 nm at 30 kV (BSE), and <12 nm at 3 kV (SE)) allowing inspection at a high resolution of non-conductive hydrated samples in their original condition with both the large field detector (LFD) and the backscatter detector (BSED, backscatter electron detector). High vacuum conditions (resolution: 3.0 nm at 30 kV (SE), 10 nm at 3 kV (SE), and 4.0 nm at 30 kV (BSE)) were used for the CP samples. The accelerating voltage was 26 kV; the vacuum was 0.40-0.50 torr; and the working distance was 10 mm.

The different types of sensilla were defined based on external morphology, following previous studies on bees (Ågren, 1989; Galvani et al., 2008; Galvani et al., 2017; Agren and Svensson, 1982; Queiroz Fialho et al. 2014). In Apoidea, they belong to the following types: sensilla placodea (SP), sensilla basiconica (SB), sensilla ampullacea (SAm) and sensilla coeloconica (SCo), sensilla coelocapitula (SCp) and sensilla trichoidea (ST). Because it was difficult in most cases to appreciate the difference between SCo and Sam (being both small depressions with a pit/hole), we considered these sensillar types together (as pit organs, PO) in the analysis, as done in previous works (e.g. Polidori et al. 2012). The sensilla trichoidea are hair-like sensilla of different shapes, lengths and thickness, and thus generally divided into subtypes. One sub-type, ST-A, was much more abundant than the other two types (about 50:1 in proportion), so we only considered this type for the quantitative analysis. ST-A were also chosen because their pored apex strongly suggests an olfactory/gustatory function, thus possibly related with host plant smelling.

Additional small and thin hair-like structures found in the studied specimens were extremely similar to non-innervated setae found in many other Apoidea (Ågren 1977, 1978, 1989; Ågren & Svensson 1982; Galvani et al. 2012;

Polidori et al. 2012; González-Vaquero & Galvani 2016), and thus here considered as the same type of structures (i.e. not as sensilla).

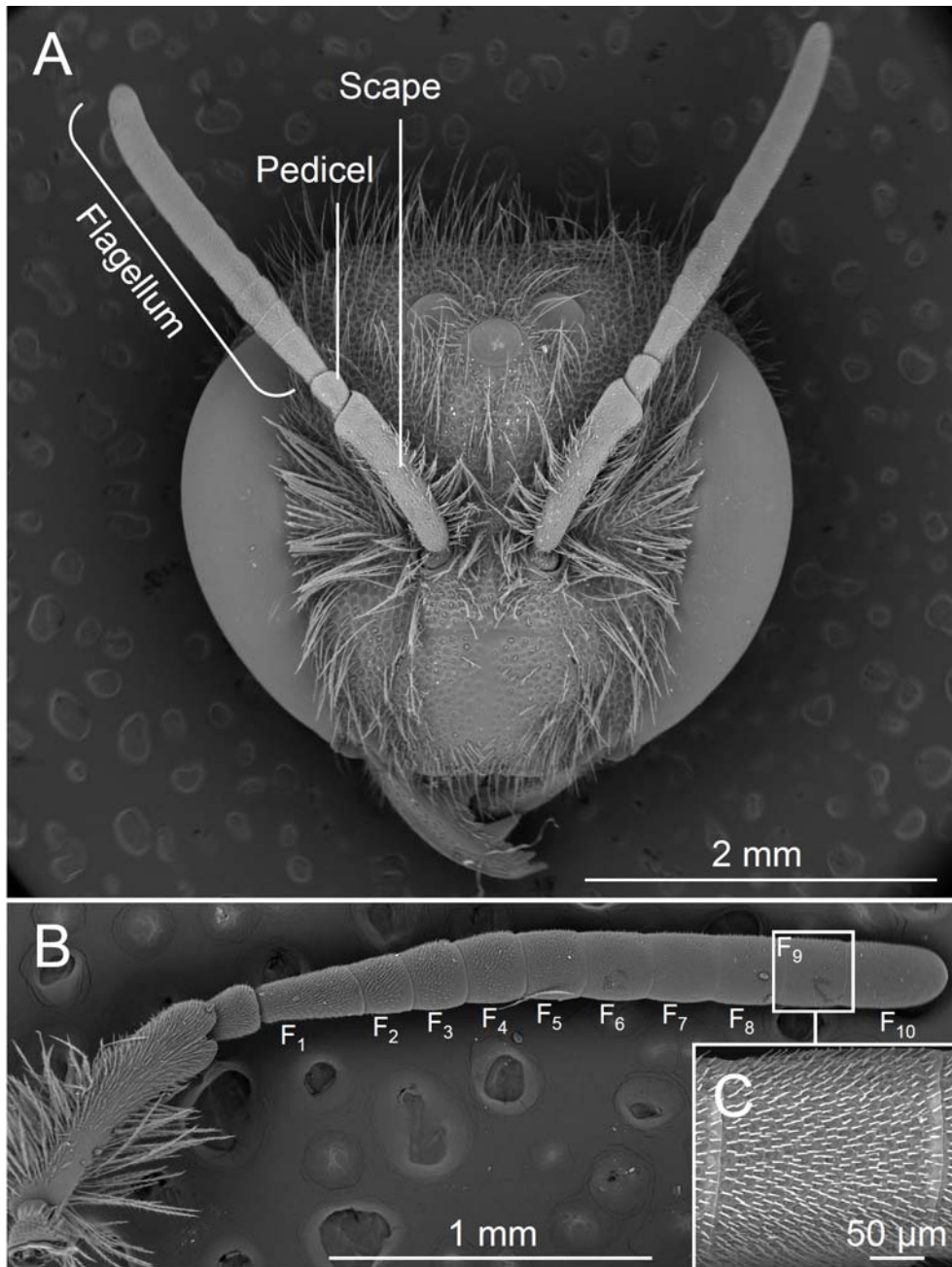


Figure 1. General morphology of a bee head and antenna (here, *Anthidium oblongatum*). A, head; B, antenna with numbered flagellomeres; C, ninth flagellomere (F₉).

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

For the main olfactory and gustatory sensilla (SP, SB and ST-A) we studied their numbers and/or density on the dorsal side of the antenna (where they are more abundant, see e.g. Polidori et al. 2012, Queiroz Fialho et al. 2014). For the remaining types of sensilla (PO, SCp, ST-B and ST-C/D) we described qualitatively their morphology and distribution. Although the observations and analyses were carried out on F₉, we also checked the occurrence of the different types of sensilla on the other segments, in order to be sure of their presence or absence on the antennae.

We counted the total number of SP and SB on the F₉, while for ST-A (in very large numbers in all the studied species, see Results) we calculated their density within a square of 100 µm x 100 µm situated approximately in the central zone of the dorsal side of F₉ (Polidori et al. 2012). For SP we also calculated the density in the same way, because this variable was used in previous studies on bees (e.g. Wcislo 1995). For these calculations, the pictures showing the whole F₉ were used.

From the pictures showing the head and the whole antennae we measured head width, while from the pictures of the F₉ we obtained their width and length, and thus a rough estimate of their dorsal area (width × length). Pictures taken at magnifications up to 10000 × were used to describe in detail the morphology of the different sensillar types.

Analysis of covariance (ANCOVA) was used to test the effects of head width and lecty (and their interaction) on the following variables: area of F₉, SP number, SP density, ST density, and SB number. The variables were not transformed before the analysis since their distribution was normal and the variance of groups homogeneous.

The recent molecular phylogeny provided in Branstetter et al. (2017) served as a base to build a hand-made tree that was used to map the evolution of sensillar equipment in the studied species (Fig. 2).

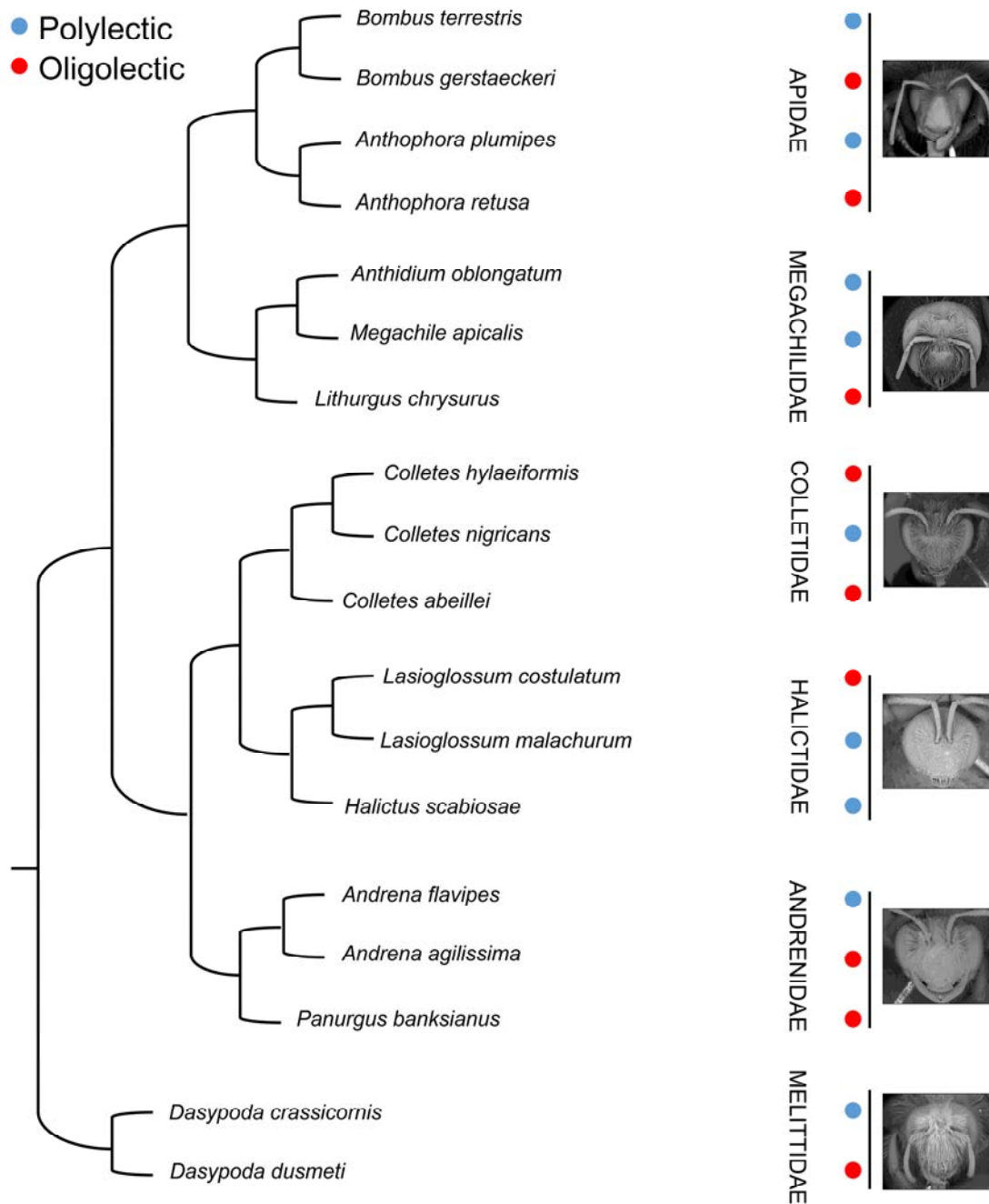


Figure 2. Phylogeny of the studied species, as retrieved from recent molecular studies (see Methods). The distribution of the lecty status is shown. SEM pictures show the heads of representative species from each of the studied bee family: *Bombus gerstaeckeri* (Apidae), *Lithurgus chrysurus* (Megachilidae), *Colletes abeillei* (Colletidae), *Lasioglossum costulatum* (Halictidae), *Andrena flavipes* (Andrenidae), *Dasypoda crassicornis* (Melittidae).

5.6.5. Results

The head width of the analysed bee species ranged from 2 mm (*Lasioglossum malachurum* (Halictidae)) to almost 5 mm (*Antophora retusa* (Apidae)) on average (Table 1). The antennae of all of the species are filiform, i.e. not as strings of beads. Antennae include a long scape at the proximal end, a rounded pedicel, and a flagellum (composed of 10 flagellomeres) (Fig. 1). In all species, the F_1 is longer than all the other flagellomeres (Fig. 1). The F_{10} is characterized to possess, ventrally, a small to conspicuous smooth area almost free of, or with very few, sensilla or setae on the tip. We recognised eight different types of sensilla (placoidea (SP), basiconica (SB) and trichoidea (ST) (three types), sensilla coelocapitula (SCp) and pit organs (PO, i.e., sensilla ampullecea (SAm) + sensilla coeloconica (SCo) (Fig. 3). All these sensilla occur on the F_9 , the flagellomere most investigated. Their overall density and diversity was, in all species, greater on the dorsal side than on the ventral side of the flagellomere (Fig. 3).

Sensilla placoidea (SP), also called olfactory discs or pore plates, are oval/elliptical-shaped, with some species having a more circular-shaped SP (e.g. *Megachile apicalis* (Megachilidae)) and other a more elongated-shape SP (e.g. *Halictus scabiosae* (Halictidae)) (Fig. 4). A joint-like membrane connects the surrounding cuticle of the plate (Fig. 4), and the plate bears many pores. They are relatively small sensilla (being about 5-15 μm the longest axis), by far the most abundant sensillar type on the bees' antennae. The number of SP varied among species from 81 to 276 (on dorsal side of F_9), and its density at F^9 ranged from 34 to 56 (Table 1).

Sensilla basiconica (SB) are also pored sensilla, with peg of about 5-15 μm perforated at the tip (Fig. 5). The external morphology of SB is remarkably similar

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

among species, though some species seem to have little thinner pegs (e.g. *Lasioglossum costulatum* (Halictidae)) while other species have thicker and more bulbous SB (e.g. *Lithurgus chrysurus* (Megachilidae)) (Fig. 5). SB vary in density, with some species lacking these sensilla on the dorsal part of the F_9 , other species having just few ones (<10), and other species having many (>20) (Fig. 5, Table 1).

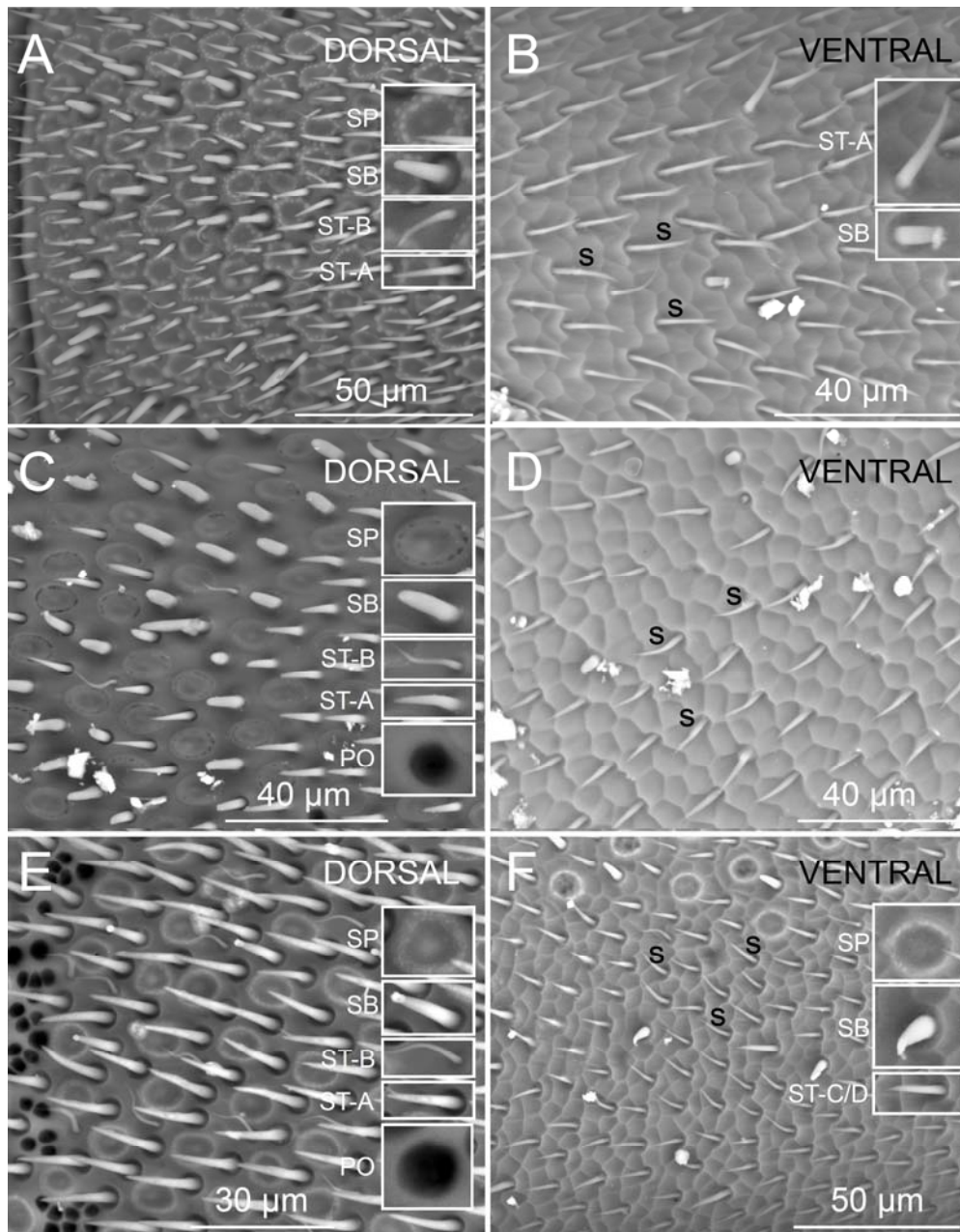


Figure 3. Examples of dorsal and ventral side of F_9 in the antennae of bees, where the found types of sensilla are shown (inset pictures). A, *Andrena flavipes*; B, *Anthophora plumipes*; C, *Colletes nigricans*.
s = setae.

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

Table 1. List of the taxa analysed in this study, together with their lecty status, the average values of the analysed variables, and the origin of the sample. UCME = Museo de Entomología de la Universidad Complutense de Madrid; CP = private collection of Carlo Polidori; LC = private collection of Leopoldo Castro. Numbers and densities refer to the dorsal side of the flagellomere.

Family	Species	Specialization	Head width (mm)	Area F ₉ (µm ²)	SB total on F ₉	SP density on F ₉	SP total on F ₉	ST density on F ₉	Origin of the sample
Andrenidae	<i>Andrena agilissima</i> (Scopoli)	OLIGOLECTIC	3.8	73313.2	0.0	40.0	226.7	118.7	CP
Andrenidae	<i>Andrena flavipes</i> Panzer	POLYLECTIC	3.5	64008.0	58.0	47.3	192.0	127.3	UCME
Andrenidae	<i>Panurgus banksianus</i> (Kirby)	OLIGOLECTIC	2.8	35812.4	16.0	43.0	102.3	160.7	UCME
Apidae	<i>Anthophora plumipes</i> Pallas	POLYLECTIC	4.6	92279.9	54.0	52.7	276.3	79.7	UCME
Apidae	<i>Anthophora retusa</i> (L.)	OLIGOLECTIC	4.8	70898.5	26.0	45.3	258.7	89.3	UCME
Apidae	<i>Bombus gerstaeckeri</i> Morawitz	OLIGOLECTIC	3.7	84353.3	23.0	24.3	149.3	76.3	LC
Apidae	<i>Bombus terrestris</i> (L.)	POLYLECTIC	3.8	83365.0	12.3	35.3	216.0	92.7	UCME
Colletidae	<i>Colletes abeillei</i> Perez	OLIGOLECTIC	3.5	55868.0	16.0	40.7	185.0	110.3	UCME
Colletidae	<i>Colletes hylaeiformis</i> Eversmann	OLIGOLECTIC	3.0	51388.0	0.0	38.0	122.7	130.7	UCME
Colletidae	<i>Colletes nigricans</i> Gistel	POLYLECTIC	3.2	50362.6	16.3	44.0	185.3	101.7	UCME
Halictidae	<i>Halictus scabiosae</i> (Rossi)	POLYLECTIC	3.3	50367.8	8.3	28.3	129.7	97.7	UCME
Halictidae	<i>Lasioglossum costulatum</i> (Kriechbaumer)	OLIGOLECTIC	2.7	50484.5	24.7	28.3	88.3	128.7	UCME
Halictidae	<i>Lasioglossum malachurum</i> (Kirby)	POLYLECTIC	2.0	27903.2	10.0	33.7	80.7	83.3	CP

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

Megachilidae	<i>Anthidium oblongatum</i> (Illiger)	POLYLECTIC	3.3	44809.9	3.7	42.7	176.0	109.3	UCME
Megachilidae	<i>Lithurgus chrysurus</i> Fonscolombe	OLIGOLECTIC	3.5	38027.2	8.3	46.0	168.7	141.0	UCME
Megachilidae	<i>Megachile apicalis</i> Spinola	POLYLECTIC	3.0	33426.9	7.3	50.3	122.3	58.3	UCME
Melittidae	<i>Dasypoda crassicornis</i> Friese	POLYLECTIC	3.2	42797.3	73.3	55.7	144.3	77.0	UCME
Melittidae	<i>Dasypoda dusmeti</i> Quilis	OLIGOLECTIC	3.2	40861.9	64.7	47.7	88.0	141.7	UCME

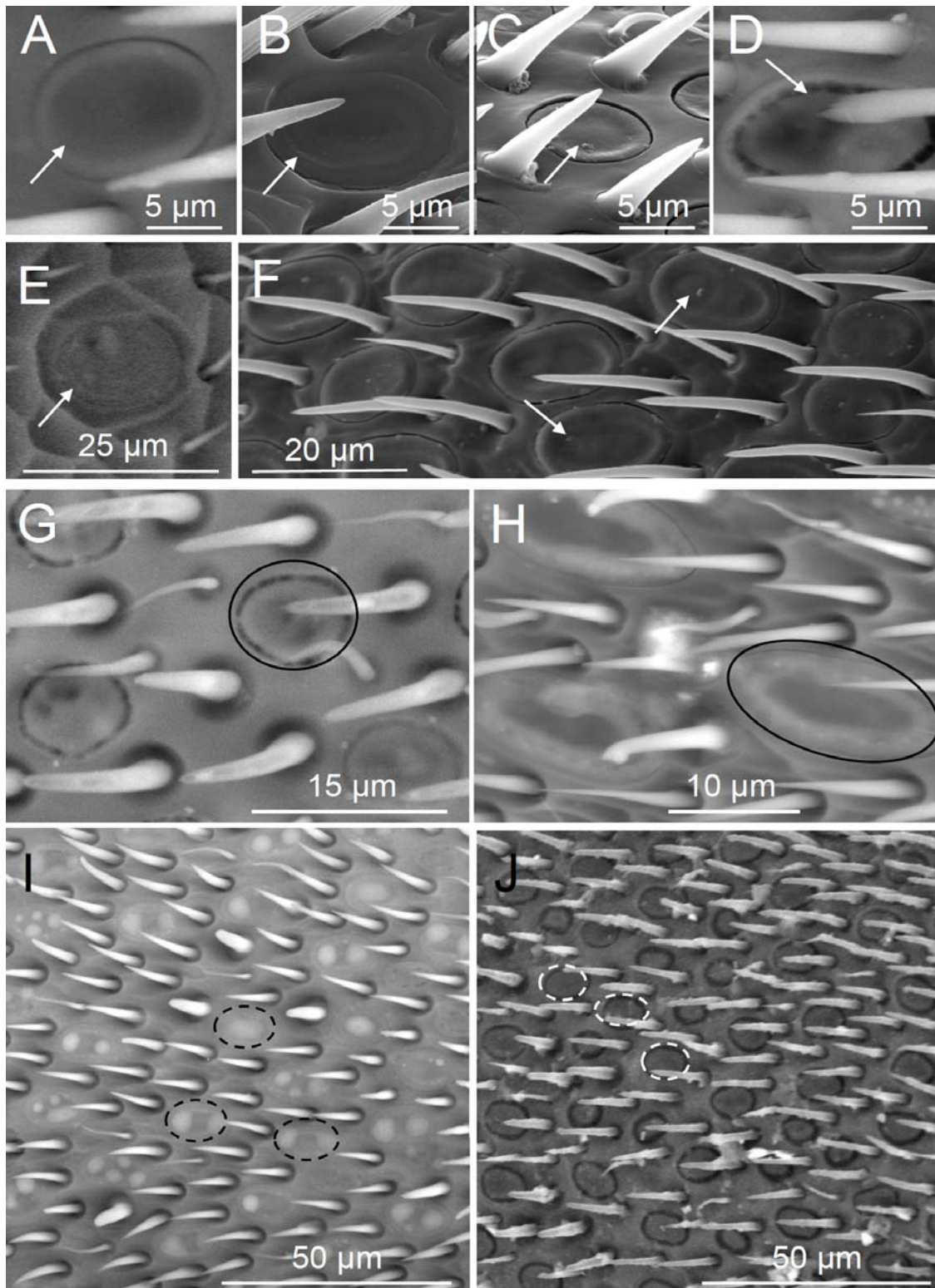


Figure 4. Examples of SP in the antennae of bees. A, *Andrena retusa*; B, *Bombus terrestris*; C, *Lithurgus chrysurus*; D, *Halictus scabiosae*; E, *Megachile apicalis*; F, *Lasioglossum costulatum*; G, *Bombus gerstaeckeri*; H, *Dasyglossa crassicornis*; I, *Bombus gerstaeckeri*; J, *Andrena agilissima*. Note in G and F the difference in SP shape, and in I and J the difference in density.

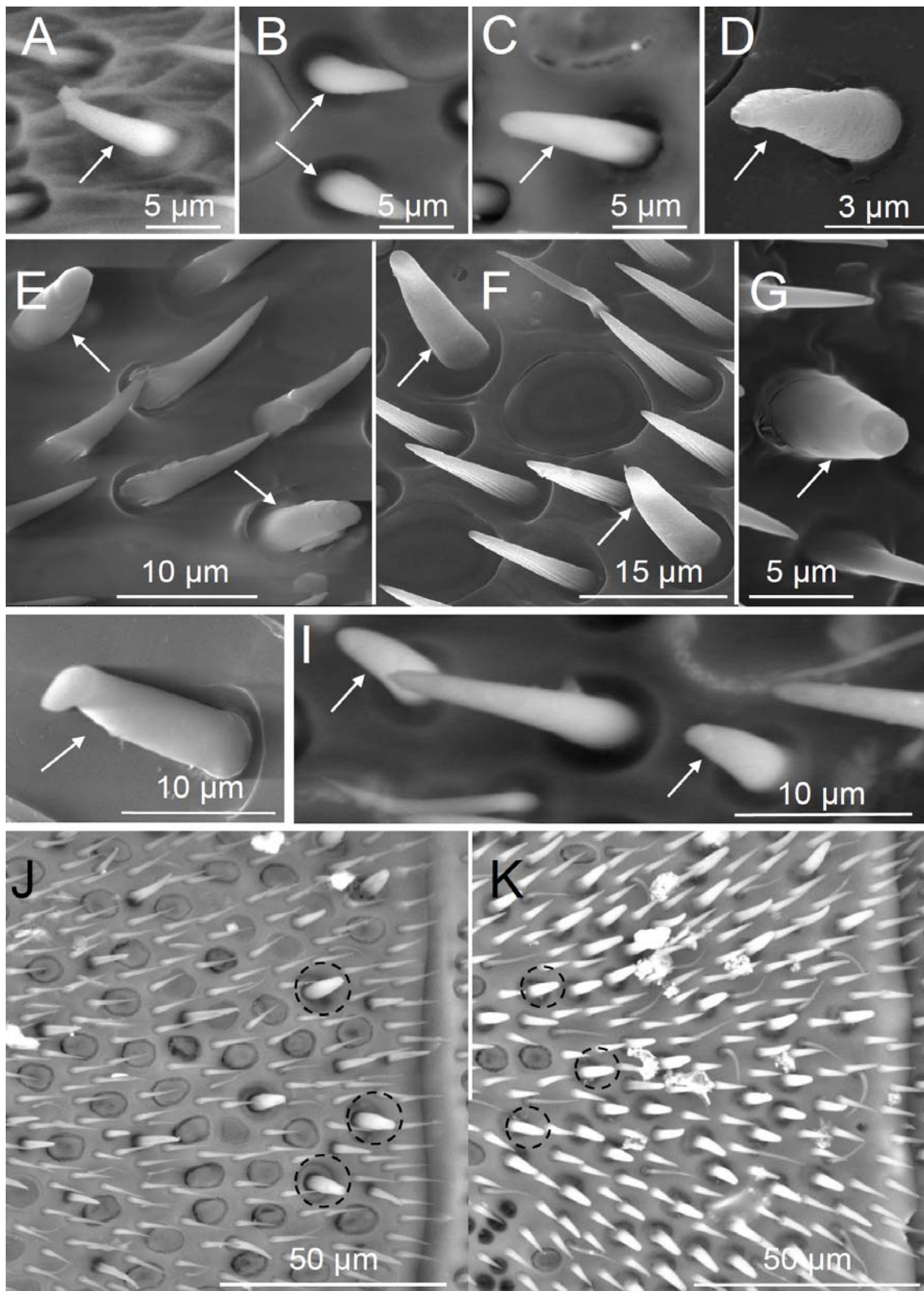


Figure 5. Examples of SB in the antennae of bees. A, *Lasioglossum costulatum*; B, *Colletes abeillei*; C, *Anthophora plumipes*; D, *Lasioglossum malachurum*; E, *Bombus gerstaeckeri*; F, *Bombus terrestris*; G, *Lithurgus chrysurus*; H, *Dasyglossa crassicornis*; I, *Colletes hylaeiformis*; J, *Panurgus banksianus*; K, *Dasyglossa dusmeti*. Note in J and H the difference in SB density.

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

Sensilla trichoidea belong to three different types. ST-A have a smooth peg and a base connected to the surrounding cuticle through a joint-like membrane (Fig. 6); ST-A range in length from about 10 to 20 μm , and their density on F^9 ranges from 58 to 160 across species (Table 1). ST-B are very thin, smooth and curved sensilla of about 5-10 μm , and they are very similar across species (Fig. 6). ST-C/D are slightly shorter than ST-A, they are sharper, thinner than ST-A and furrowed longitudinally (Fig. 6).

Pit organs (PO) can occur typically in clusters on a flagellomere (Fig. 7), most often on the ventral and lateral side; they can be observed as cuticular, circular and small openings of about 1-2 μm of diameter (Fig. 7). In some species, like in *Colletes abeillei* (Colletidae), PO form very dense clusters and the openings are very irregular; in other species, like in *Bombus terrestris* (Apidae) the opening are almost perfectly circular (Fig. 7). Although it is very difficult to discriminate, PO are known to include two types in bees: the sensilla coeloconica and the sensilla ampullecea.

Sensilla coelocapitula (SCp) possess a button-like knob with an irregular surface, which emerges from an opening inside an irregular oval concavity (Fig. 7). SC were generally observed in groups of 2-3 sensilla (Fig. 7); the knob of SC was about 2-3 μm . The external morphology was very similar among species.

The head width was similar between oligolectic and polylectic species (Fig. 8), and similarly the area of the dorsal side of F_9 was similar between the two groups of species (Fig 8). SP number, SP density and SB number was a bit lower in oligolectic species, compared with polylectic species (Fig. 8). The ANCOVA showed, however, that for any of these variables the differences between the two groups of species was significant (Table 2, Fig. 9). Furthermore, the only variable significantly explaining the difference in SP number was head width (Table 2, Fig. 9). ST density, on the other

hand, was slightly higher in oligolectic species, compared with polylectic species (Fig. 8), and lecty (but not head width) explained significantly the variance in ST density (Table 2, Fig. 9).

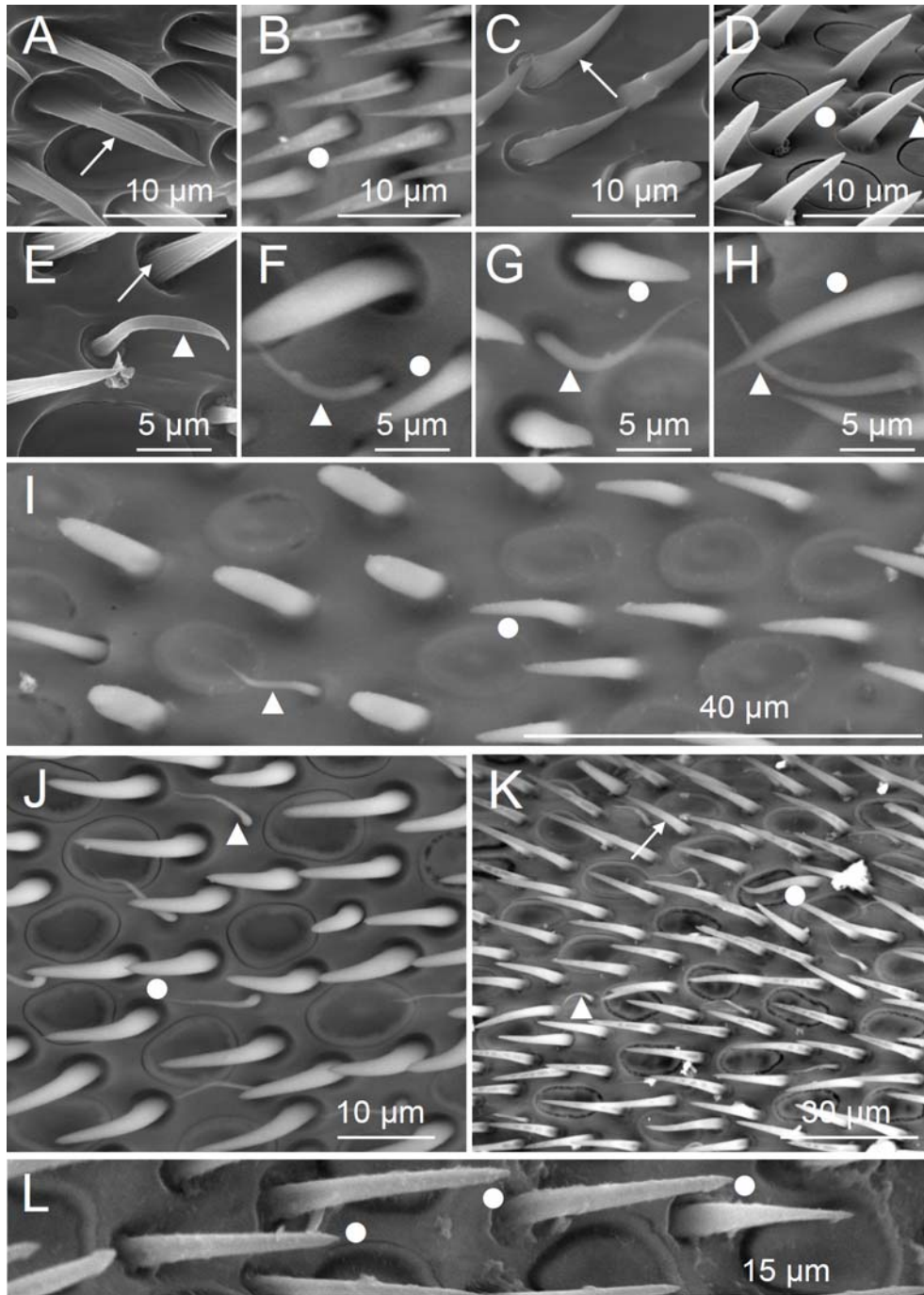


Figure 6. Examples of ST in the antennae of bees. A, *Bombus terrestris*; B, *Panurgus banksianus*; C, *Bombus gerstaeckeri*; D, *Lithurgus chrysurus*; E, *Bombus terrestris*; F, *Andrena retusa*; G, *Colletes abeillei*; H, *Dasypoda crassicornis*; I, *Anthophora plumipes*; J, *Colletes hylaeiformis*; K, *Halictus scabiosae*; L, *Andrena agilissima*. Circles indicate ST-A, triangles indicate ST-B and arrows indicate ST-C/D.

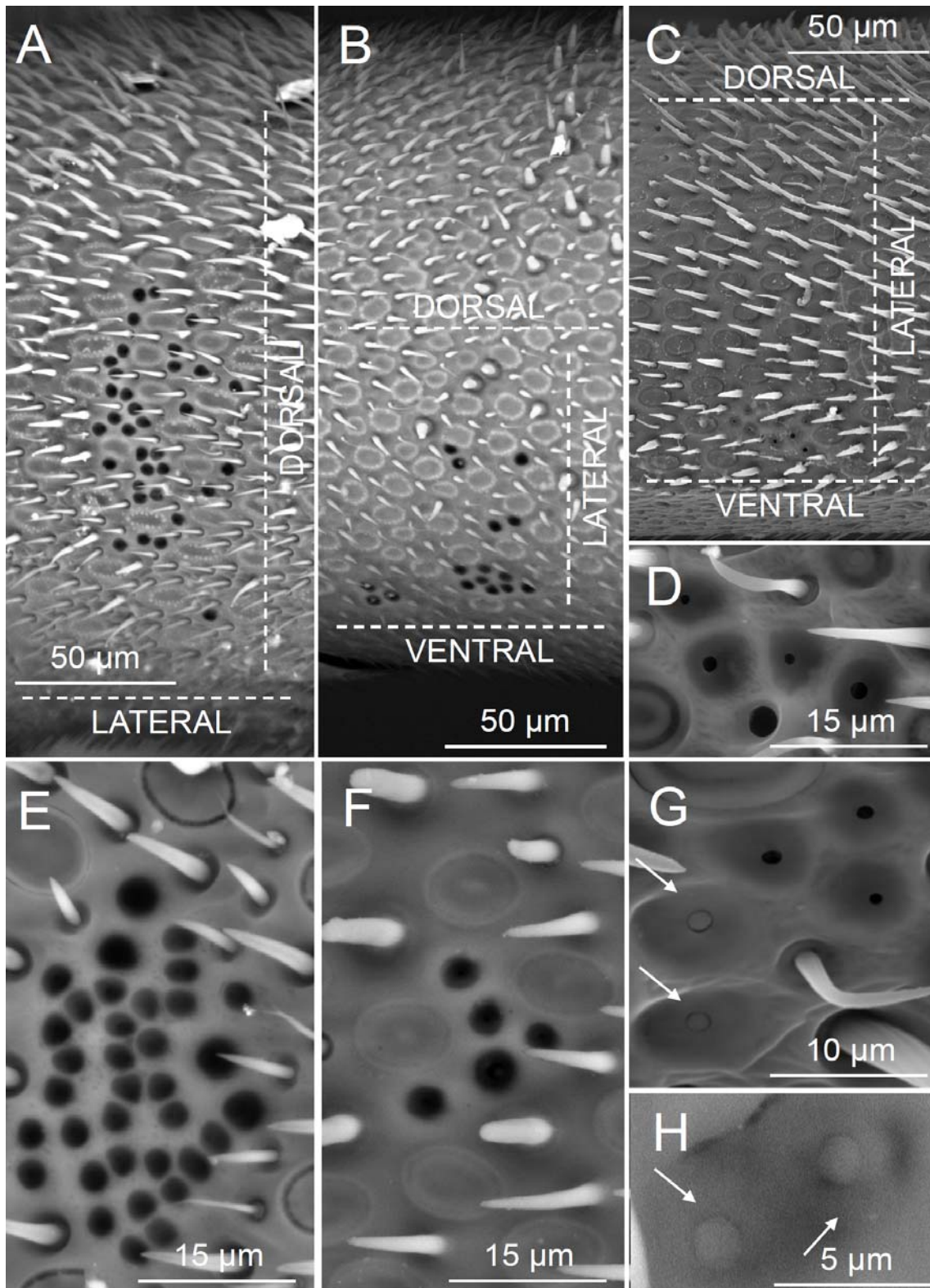


Figure 7. Examples of PO and SC in the antennae of bees. A, *Lasioglossum costulatum*; B, *Andrena flavipes*; C, *Anthidium oblongatum*; D, *Bombus terrestris*; E, *Colletes abeillei*; F, *Anthophora plumipes*; G, *Bombus terrestris*; H, *Dasyglossa dusmeti*.

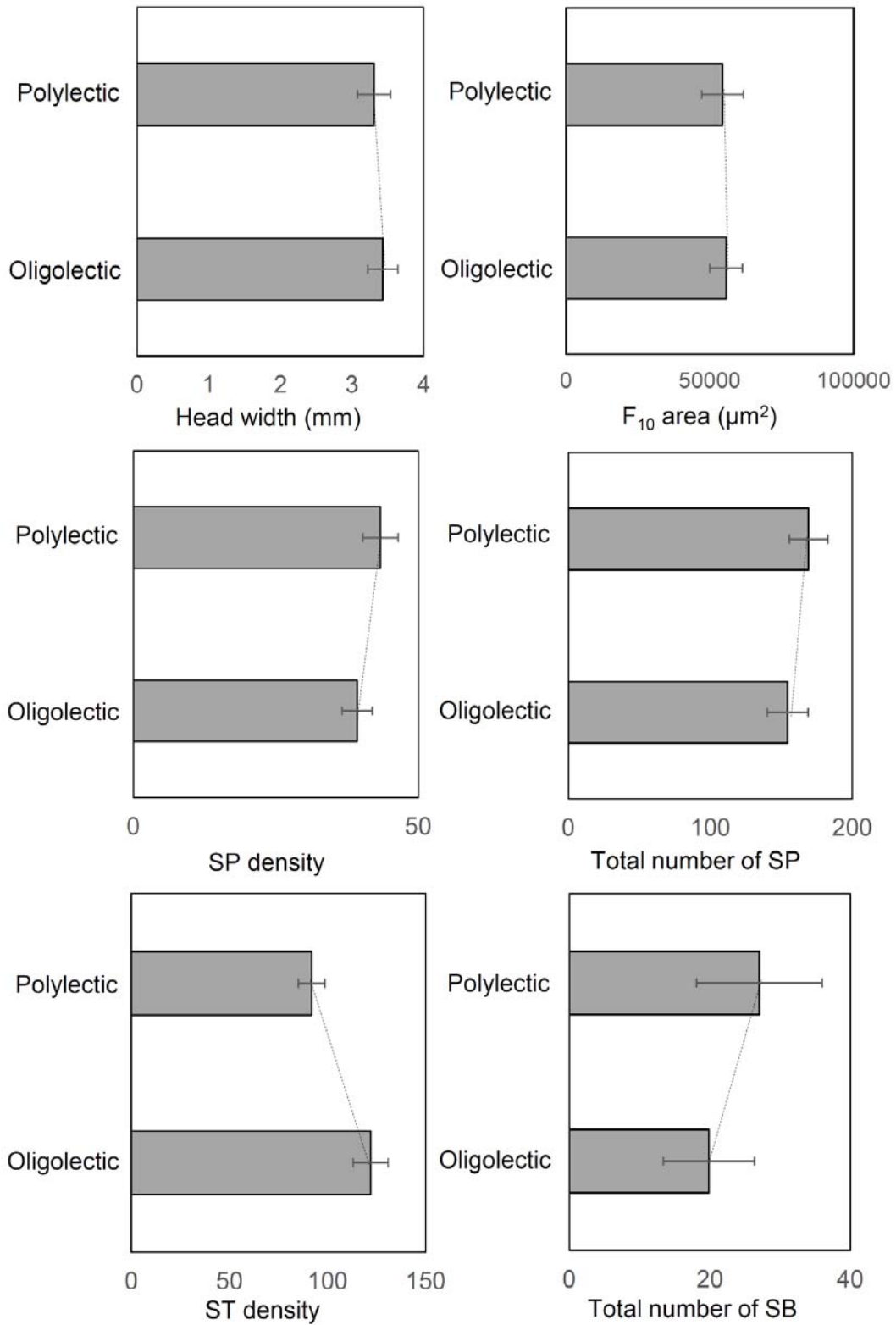


Figure 8. Mean values and standard errors of the considered variables related with body size (head width), antennal size (area of F₉) and sensillar equipment (SP number, SP density, SB number and ST-A density).

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

Table 2. Results of the Analysis of Covariance (ANCOVA). SS = Sum of Squares; MS = Mean Square.

F9 area	DF	SS	MS	F	P
Model	3	4060815910.359	1353605303.5	9.244	0.001
Error	14	2050087058.428	146434789.9		
Corrected Total	17	6110902968.788			
Head width	1	3608005802.128	3608005802.1	24.639	0.000
Lecty	1	212973809.664	212973809.7	1.454	0.248
Head width × Lecty	1	238958733.381	238958733.4	1.632	0.222
SP density	DF	SS	MS	F	P
Model	2	188.562	94.281	1.301	0.301
Error	15	1086.969	72.465		
Corrected Total	17	1275.531			
Head width	0	0.000			
Lecty	0	0.000			
Head width × Lecty	1	3.690	3.690	0.051	0.825
Total number of SP	DF	SS	MS	F	P
Model	3	48557.638	16185.879	25.500	< 0.0001
Error	14	8886.393	634.742		
Corrected Total	17	57444.031			
Head width	1	47489.860	47489.860	74.818	< 0.0001
Lecty	1	413.316	413.316	0.651	0.433
Head width × Lecty	1	120.087	120.087	0.189	0.670
ST density	DF	SS	MS	F	P
Model	3	6796.316	2265.439	5.127	0.013
Error	14	6186.307	441.879		
Corrected Total	17	12982.623			
Head width	0	0.000			
Lecty	1	2940.549	2940.549	6.655	0.022
Head width × Lecty	1	1841.241	1841.241	4.167	0.061
Total number of SB	DF	SS	MS	F	P
Model	3	1135.961	378.654	0.674	0.582
Error	14	7860.483	561.463		
Corrected Total	17	8996.444			
Head width	1	384.605	384.605	0.685	0.422
Lecty	1	302.420	302.420	0.539	0.475
Head width × Lecty	1	435.651	435.651	0.776	0.393

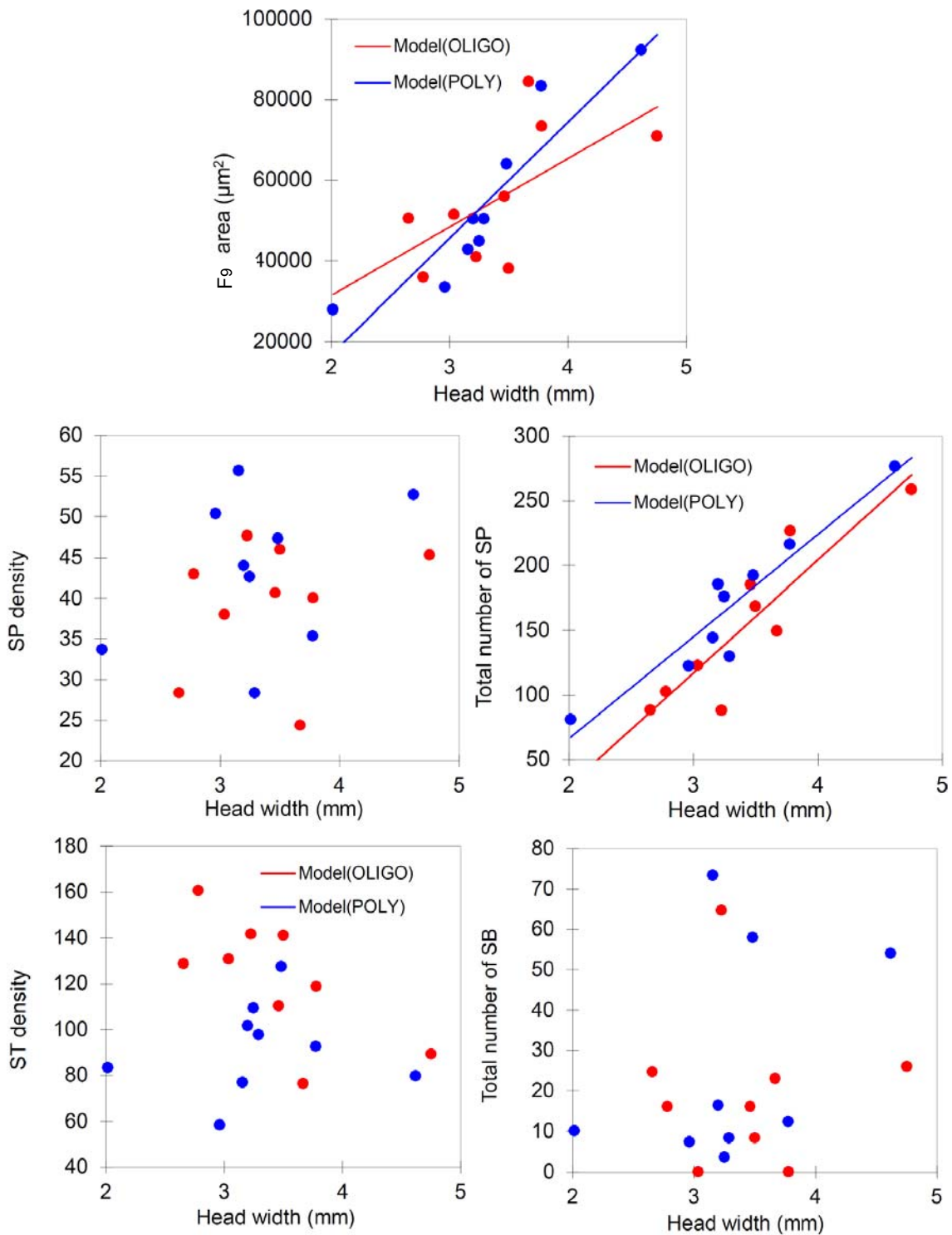


Figure 9. . Regression plots showing the results of the ANCOVA. Regression lines are shown only when head width was significant in explaining the variance of the dependent variables. Significant difference between oligolectic and polylectic species – and no effect of head width – was observed only for ST density.

5.6.6. Discussion

In this study, we have contributed to the analysis of the external morphology of the sensilla in Hymenoptera. This is a research topic important in the study of anatomic-physiological traits (i.e. organization of the nervous system), in behavioural-ecological traits (i.e. nest-mate recognition, mating interactions, host choice, pollen choice) and even in elucidating taxonomic relationships among species (Ozaki et al., 2005; van Baaren et al., 2007; Nishino et al., 2009; Basibuyuk and Quicke, 1999).

In bees, detailed studies on morphology, distribution and diversity of antennal sensilla are still scarce and to date were only performed on few lineages, notably Apidae (Galvani et al., 2008; Galvani et al., 2012; Queiroz Fialho et al. 2014; Galvani et al., 2017) as well as few species from other families (Ågren 1977, 1978, 1989; Ågren & Svensson 1982). This scarcity of studies contrasts with the known crucial role of olfactory and mechanical signals perceived by the antennae in mating, foraging, flower recognition and appetitive responses of bees (Haupt, 2007; Spaethe et al., 2007; Riveros and Gronenberg, 2010). Here we added novel information on the sensillar equipment of species from families previously unexplored in detail, such as Melittidae and Megachilidae, as well as new data on species previously not studied from families already subject of such research topic, such as Halictidae and Apidae). These data are thus important in building a solid database of sensillar equipment in bees for future larger comparative studies.

According with the previous studies on bees, we found eight different types of sensilla (placoidea (SP), basiconica (SB) and trichoidea (ST) (three types), sensilla coelocapitula (SCp) and pit organs (PO, i.e., sensilla ampullecea (SAm) + sensilla coeloconica (SCo) (Dietz and Humphreys, 1971; Stort and Silva-Moraes, 1998, 1999; Azevedo et al., 2008; Galvani et al., 2008).

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

The most abundant type is by far ST-A, followed by SP and other types of ST. The relative frequency of these types of sensilla was similarly found in other species of bees studied so far, for examples species of the tribes Emphorini, Apini and Eucerini (Apidae) (Gupta 1992; Galvani et al. 2012; Queiroz Fialho et al. 2014), as well as species of the genus *Sphecodes* (Halictidae) (Ågren & Svensson 1982). In some species of corbiculate Apidae, ST-A could reach very high number on, with values of more than 10000 per mm² in some species (Gupta, 1992; Ågren and Hallberg, 1996). However, this pattern is not universal: for example, in *Apis mellifera* and various species of Meliponini (Apidae: Apinae), ST-A were less abundant than SP (Silva De Moraes and Da Cruz Landim, 1972; Esslen and Kaisling, 1976; Johnson and Howard, 1987). Interestingly, Apis and Meliponini include only highly eusocial species (very large perennial colonies), while in our sample the social species considered (*Bombus*, *Lasioglossum*, *Halictus*) were primitively eusocial (smaller colonies with annual cycle). In any case, it is clear that both ST-A and SP are the most abundant sensillar types on bee antennae.

ST may be particularly important in bee-bee social interactions. For example, Wittwer et al. (2017) found higher densities of hair-like sensilla (ST) in social species of *Lasioglossum* compared with secondarily solitary species of *Lasioglossum*, but no differences in SP densities. On the other hand, because bees use olfactory (as well as visual) cues to locate host plants (Dötterl et al., 2005; Dötterl and Schäffler, 2007; Howell and Alarcón, 2007), it was suggested that SP (which have a clear olfactory function, being multiporous single-walled sensilla known to respond to volatiles (Spaethe et al. 2007)) may be the most important sensillar type for the detection of plant chemicals. This would reflect into difference between oligolectic and polylectic species. However, this difference was not found in our sample of species, since SP number or density did not vary with lecty. This agrees with previous results on Eucerini bees, in which a direct correlation between the range of abundance of olfactory sensilla

and floral preference was not detected. Although very few species were analysed in his study, Wcislo (1995) also did not find this relationship for Halictidae. SP number was found to increase with head width, partially according with the results of Wcislo (1995), although in his study it was SP density to vary with bee size. Such relationships seem to be even stronger within species, as it is the case of *B. terrestris* (Spaethe et al. 2007). In other (non-Apoidea) Hymenoptera, however, a relationship between SP number or density and foraging ecology (in term of niche width) was found. For example, the generalist braconid parasitoids *Cotesia glomerata* (L.) and *C. marginiventris* (Cresson) exhibit less SP than their specialist relatives *C. rubecula* (Marshall) and *Microplitis croceipes* (Cresson) (Ichneumonoidea: Braconidae) (Bleeker et al. 2004; Sharma et al. 2011). Within the apoid wasp subfamily Philanthinae (Crabronidae), species that only hunt for beetle prey seem to possess greater SP density than species that only hunt for bee prey (Polidori et al. 2012).

On the other hand, we found oligolectic species having a higher density of ST-A than polylectic species. Thus, possibly ST are important in both social interactions (Wittwer et al. 2017) and plant recognition (our results), with specialized species perhaps needing more ST sensilla to detect specific odours from their few host plants. For example, the oligolectic *Echium*-specialist *Hoplitis adunca* (Panzer) (Megachilidae) females detect host flowers by the specific floral volatile 1,4-benzoquinone (Burger et al. 2011), while the *Salix* specialist *Andrena vaga*, is sensitive to 1,4-dimethoxybenzene (Dötterl et al., 2005a). ST-A have been described as single-walled hairs with wall pores, suggesting that they most likely have an olfactory function (Ågren et al. 1996), so maybe they can effectively be able to detect specific substances and need to be in high density to work properly. In fact, it is known that increased sensilla density increased antennal sensitivity in bees (Spaethe et al. 2007). The other types of ST (ST-B and ST-C/D) are much rarer on the antennae of the studied bee species, and present a similar morphology across species. These findings agree with what observed

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

in many other bee species (Esslen and Kaissling, 1976; Ågren and Sevensson, 1982; Shang et al., 2010; Ågren and Hallberg, 1996; Galvani et al. 2012). ST-C/D seem to be gustative receptors (Groh et al., 2002; Haupt, 2007), while ST-B seem to be tactile receptors (Martin and Lindauer, 1966; Haupt, 2007).

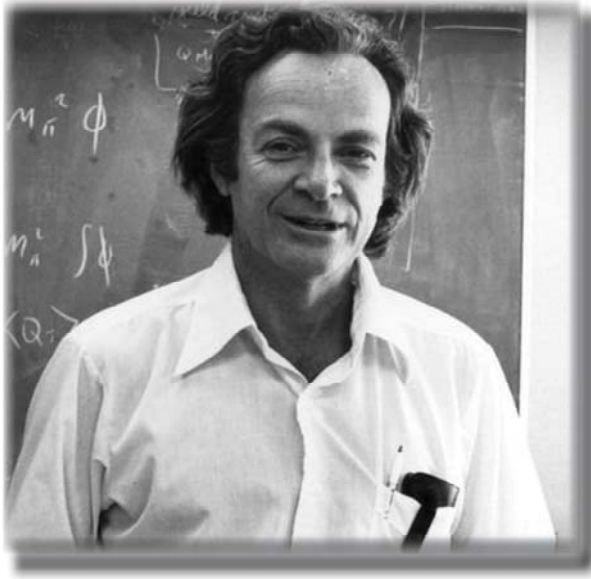
SB are not very abundant on the antennae of the studied bees and their morphology was also similar across species, eventually differing weakly in the thickness of the peg. SB are particular sensilla in bees since they generally lack in males (Esslen and Kaissling, 1976; Ågren, 1977, 1978; Ågren and Sevensson, 1982; Galvani et al. 2012). These sensilla tend to be more slender and elongated compared with SB found in apoid wasps (the group from which bees arose) (Polidori et al. 2012). SB are olfactory or gustatory organs (Martini 1986); in ants, it was shown that SB are differentially sensitive to cuticular hydrocarbons (the substances which bear most of signals and cues in insects), showing broad-spectrum sensitivity and allowing the discrimination of nestmates from non-nestmates (Sharma et al. 2015). An ultrastructural study performed in *Apis mellifera* suggests SB to have a gustatory function (termed chaetica type II, Whitehead and Larsen, 1976). In our studied species, the lack of difference between oligolectic and polylectic species suggest that they could be not involved in host plant recognition. However, there could be a role of SB in host specialization in parasitoid wasps. For example, in *Alloxysta consobrina* (Cynipoidea: Figitidae), the greater abundance of SB, compared with the congeneric *A. victrix*, may be related with the fact that the latter species attacks about 30% more aphid species than *A. consobrina* and about twice the number of aphid parasitoid species attacked by *A. consobrina* (Ferrer-Suay et al. 2014; Polidori et al. 2016).

PO and SCp described from our studied species closely resemble those described for other Apoidea (e.g. Polidori et al. 2012; Galvani et al. 2012; Queiroz Fialho et al. 2014). While PO are always found in Apoidea, SCp notably lack in several

Capítulo VI: Especialización sensorial en Apidae

bee (e.g. *Hylaeus communis* Nylander (Colletidae)) and apoid wasp (e.g. *A. furgei* (Crabronidae: Bembicinae)) species (Ågren 1977, 1989). PO act as temperature- and/or humidity-receptors in *A. mellifera* and in ants (Lacher et al. 1964; Ruchty et al., 2009; Nakanishi et al., 2009). Furthermore, PO seem to act additionally as CO₂-receptors in ants (Kleineidam et al. 2000). SCp are most likely mechanoreceptors (Esslen et al., 1976).

In conclusion, in this study we provided for the first time the description of the antennal sensory system in species from previously unexplored lineages, and we also found that, to some extent, sensillar number (ST-A density in our case) may have been evolutionarily influenced by host plant specialization (lecty). During bee evolution, oligolectic bees have evolved from polylectic ancestors in some lineages (e.g., in the genus *Lasioglossum*, where oligolectic species have evolved twice within polylectic clades (Danforth et al. 2003)), while in some clades the transition occurred from oligolecty to polylecty. For example, the most basal bee family (Melittidae) includes many pollen specialists (Westrich 1989; Wcislo and Cane 1996; Patiny et al. 2007), suggesting an oligolectic ancestor (Michez et al. 2008), and within the genus *Andrena* (Andrenidae) and within the megachilid tribe Anthidiini, oligolecty is also ancestral (Larkin et al. 2008; Muller 1996; Mauss et al. 2006). Thus, future studies on the effect of plant specialization on bee sensory system should enlarge the species sample in order to cover many lineages even within families, and then incorporate detailed phylogenetic information in the statistical analyses, because it is not predictable if phenotypic changes occur in the same way from oligolecty to polylecty and from polylecty to oligolecty.



*“No me siento aterrorizado por no
conocer cosas, por estar perdido en el
misterioso universo sin tener
ningún propósito, pues éste es el modo
en el que la realidad es”.*

Richard Feynman

VI

Discusión Integradora

Aunque el uso de información exclusivamente morfológica se ha ido abandonando progresivamente por las principales corrientes en taxonomía centradas en datos exclusivamente moleculares, es verdad que los errores detectados en la identificación de las secuencias depositadas en las bases de estos datos de referencia como Gene Bank, así como las incongruencias de los resultados filogenéticos basados en datos moleculares, comparados con los datos morfológicos, han hecho que en los últimos años fueran más utilizados los análisis combinados, basados tanto en datos morfológicos como moleculares. Hoy día las corrientes actuales de taxonomía integradora defienden que todos los datos disponibles que aporten información sobre los ejemplares de estudio son útiles y deben ser usados de manera combinada para completar la taxonomía y filogenia de un grupo dado (Padial *et al.*, 2010). En la actualidad los nuevos desarrollos tecnológicos novedosos han dado de nuevo un fuerte impulso a la investigación estructural sobre morfología y anatomía de insectos. Enfoques innovadores como la tomografía computerizada (Hörnschemeyer *et al.*, 2002) con la capacidad de reconstrucciones en 3D (Beutel & Haas, 1998), aplicaciones combinadas de diferentes técnicas (Beutel *et al.*, 2011) y el concepto de morfología evolutiva (Wirkner & Richter, 2010) han llevado a un notable renacimiento en la morfología de insectos en la última década (Seltmann *et al.*, 2013).

Por tanto, a pesar de que en las próximas décadas la anatomía-morfología de los artrópodos se seguirá estudiando vigorosamente a nivel molecular, vanguardia de la biología moderna, no debe interpretarse que los estudios de anatomía-morfología clásica en los niveles macro y micro ultraestructurales y/o subcelulares combinados con los conocimientos sobre su ecología no serán necesarios o se volverán irrelevantes; por el contrario, tales estudios servirán como prerrequisitos para aquellos a nivel molecular.

En el futuro, la morfología y la anatomía de los insectos junto a su ecología tendrán el potencial imprescindible para hacer frente a los desafíos de la investigación de los

tiempos venideros y adquirirán la promesa de ofrecer la complementariedad ideal a la biología molecular.

En este sentido, esta memoria trata de aportar nuevos conocimientos sobre si las estrategias vitales y especializaciones ecológicas que presenta el orden Hymenoptera afectan a su morfología externa, y en este caso cómo y en qué medida. En concreto se han estudiado la estructura cuticular de sus mandíbulas, la bioquímica de la coloración de su cutícula y pubescencia y la morfología de sus antenas en un intento de establecer patrones ecomorfológicos que demostrarían el valor adaptativo de estos rasgos. Ha sido muy importante contar con técnicas analíticas no destructivas que pudieran utilizarse en ejemplares provenientes de Colecciones de Historia Natural, un recurso muy valioso para estudios comparativos en los que es necesario evaluar gran número de taxones para realizar los análisis estadísticos.

En los **capítulos 1 y 2** se ha tratado de inferir cómo ha evolucionado la morfología bucal, concretamente en la incorporación de metales a su cutícula, en diferentes linajes de himenópteros en función del tipo de alimento que consumen y/o de sustrato donde se reproducen. La naturaleza química del endurecimiento de la cutícula por la presencia de metales sigue siendo un interrogante a resolver. En el **capítulo 1** se ha realizado una nueva aproximación metodológica, cuyos resultados sostienen que la presencia de metales (concretamente el Zn) en las mandíbulas no es el responsable en sí misma del cambio estructural de la cutícula, sino que, además, los metales deben estar en niveles relativamente elevados (≥ 7 wt%) para que se produzca el cambio de estructura que es observable por la aparición de bandas espectrales cátodoluminiscentes en la región del ultravioleta. Estas bandas han podido ser identificadas comparando estos espectros con los espectros de diferentes minerales con contenido de cinc y corresponden a enlaces O-Zn-O, Zn-Cl, Zn-O y grupos -OH. Las diferentes contribuciones químicas relativas podrían favorecer ciertamente a las propiedades mecánicas de la cutícula alterando sus propiedades funcionales. Los altos niveles de cinc encontrados, en el orden Hymenoptera sugieren

que el cinc pueda estar presente como una fase salina cristalina o formando grupos de baja cristalinidad interviniendo en procesos de biomineralización, a diferencia de los resultados de otros autores como Schofield (2001), Lichtenegger *et al.* (2003) o Birkedal *et al.* (2006) en cuyos estudios no encontraron una matriz cristalina por lo que dedujeron que el cinc debía de estar formando parte de un complejo proteico.

Observando las relaciones filogenéticas entre los diferentes taxones analizados se puede apuntar que el cambio estructural producido por la incorporación de altos porcentajes de Zn es muy similar entre ellos y, aparentemente es independiente de su posición filogenética. Por ejemplo, las avispas de la familia Mutillidae y las de la familia Cynipidae se encuentran en dos grupos distantes (Vespoidea y Cynipoidea), con muy diferentes estrategias de vida, sin embargo, tienen espectros CL similares al compartir porcentajes altos de enriquecimiento de Zn, mientras que *Discoelius zonalis* (Panzer, 1801), (Vespidae) que está más estrechamente emparentado con *Nemka viduata* (Pallas, 1773) (Mutillidae) (ambos en Vespoidea) mostraron muy diferentes porcentajes de Zn en sus mandíbulas y también, como cabría esperar, diferentes espectros CL.

Estos resultados, aunque esclarecedores, arrojan nuevos interrogantes sobre el papel ecomorfológico del Zn en las mandíbulas del orden Hymenoptera, por ejemplo, ¿se podría determinar el posible efecto del ancestro común en la incorporación del Zn?, es decir, ¿la presencia de Zn representa un carácter adaptativo o únicamente es un rasgo en sus diferentes ciclos de vida? En el **capítulo 2** se abordó esta cuestión estudiando 96 especies del orden que abarcan 65 familias y 24 superfamilias y donde se observó que el metal está ausente en las tres superfamilias de "Symphyta" más primitivas, mientras que está presente de forma variable en Apocrita ("Terebrantia" + Aculeata). Se ha documentado que la presencia de Zn ocurre en la mayoría de las familias que componen el suborden "Terebrantia" y en todas las familias de Chrysidioidea, Formicoidea y en Pompiloidea, sin embargo, es un rasgo

ausente en la mayoría de los Apoidea. Algunos autores como Quicke *et al.*, (1998) observaron una clara correlación entre los altos niveles de cinc y su especialización de emerger de sustratos duros, hábitat de sus larvas, lo que les permitió establecer que el enriquecimiento de cinc apareció una vez en Symphyta, cuando Unicalcarida se separó del resto del grupo conservándose posteriormente en Apocrita, con la excepción de dos familias: Pelecinidae (Proctotrupeoidea) y Vespidae (Vespoidea) (ambos considerados como reversiones). En este trabajo, más ampliado, se muestra que aunque el rasgo de enriquecimiento por Zn está bastante extendido en el orden, está sobrevalorado conforme han sugerido otros estudios. Se confirma que la forma para endurecer la cutícula por Zn no parece ancestral en el orden, como apuntaba Quicke *et al.* (1998) ya que el Zn está ausente en tres grupos basales de "Symphyta", y aparece por primera vez en Siricoidea, es decir, en correspondencia con la transición a un hábito larvario xilófago, conservándose invariablemente hasta su pérdida en la familia Agaonidae (avispa de las higueras), la única familia de Chalcidoidea que carece de Zn en sus mandíbulas. Por tanto, para algunas especies emergentes de sustratos duros (por ejemplo, las familias basales de "Terebrantia", familia Evanioidea, Stephanoidea o Trygonaloidea), otras especies especializadas en cortar hojas para hacer nidos o depredadoras de otros insectos como los véspidos, que requerirían altos niveles de endurecimiento de sus mandíbulas, no se ha encontrado una correlación. Tampoco los resultados concuerdan con la hipótesis de que el Zn provenga del hospedador ya que, por ejemplo, las avispas gallícolas solo se alimentan de tejidos vegetales y prácticamente todas ellas presentan una morfología bucal con cambio estructural por la presencia del metal (faltaría por demostrar que las especies con porcentajes de Zn entre el 1.0-5.0% wt como por ejemplo *Diplolepis rosae* (Linnaeus, 1758) o *Periclistus brandtii* (Ratzeburg, 1831) también presentan cambio estructural en la cutícula mandibular) o las especies cleptoparasitas como los crisídidos que se alimentan de los mismos recursos que las especies a las que parasita solo hay

presencia del metal en las primeras, por lo que es poco probable que una dieta deficiente o rica en Zn determine su incorporación en las mandíbulas de los adultos.

A tenor de estos resultados, que contrastan con varios trabajos sobre la presencia de metales en el ovopositor de himenópteros como consecuencia de la adaptación a la perforación de sustratos duros como Quicke *et al.* (1998, 2004) y Polidori *et al.* (2013), se baraja que la más plausible explicación para la incorporación de Zn a las mandíbulas sea consecuencia de su historia evolutiva que haga más probable la aparición de unas respuestas morfológicas que otras y no un patrón ecomorfológico basado en las especializaciones en los métodos de alimentación y reproducción del orden Hymenoptera..

En los **captítulos 3 y 4**, siguiendo con los estudios ecomorfológicos de la cutícula, se abordó el color como una de las características distintivas de la gran variabilidad fenotípica en los insectos. En muchos casos los patrones de color observados dependen de la incorporación de pigmentos a su cutícula o pubescencia, rasgo extremadamente variable entre especies, individuos dentro de la especie, así como en distintas etapas de sus vidas como indican los trabajos de Majerus (1998) y Wittkopp & Beldade (2009). Se decidió pues identificar la presencia y la distribución de los pigmentos biológicos más prevalentes en la naturaleza, las melaninas, y cómo afectan sus niveles en la diversidad del patrón de pigmentación dentro del orden Hymenoptera. En el **capítulo 3** se documenta la presencia de eumelanina y feomelanina en diferentes partes del cuerpo de avispas parasitoides macho del género *Mesopolobus* (Chalcidoidea, Pteromalidae) en estructuras anatómicas concretas, como son las patas y antenas, cuya función es formar parte del cortejo para la atracción de la hembra. Se ha identificado como eumelanina el pigmento responsable del color oscuro de la clava antenal de todo el género estudiado, con una importante función en el apareamiento. Especialmente interesante es la presencia de feomelanina en áreas de colores claros tanto del fémur de *M. tibialis* (Westwood, 1833) como de *M.*

xanthocerus (Thomson, 1878). Durante la síntesis de feomelanina se necesita cisteína, un aminoácido muy presente en el glutatión, una molécula defensiva esencial contra el estrés oxidativo. El glutatión inhibe competitivamente la síntesis de feomelanina. Sin embargo, los costos inherentes a la síntesis de feomelanina pueden resultar claramente beneficiosos a las especies que lo tengan, como una etiqueta de calidad. La producción de feomelanina también está relacionada con las condiciones del medio ambiente. Este escenario fue propuesto en el trabajo de Galván *et al.* (2015), donde se concluye que la feomelanina es raramente detectada en animales que viven con elevados niveles de estrés. Además, varios autores han documentado que las poblaciones con mayor grado de melanización viven en ambientes más fríos, sin embargo, aquí se ha encontrado que todas las especies estudiadas tienen una distribución superpuesta y viven como adultos en ambientes muy similares. Por tanto, es poco probable que la asociación entre la producción de feomelanina, las condiciones ambientales y la latitud estén influyendo en la melanogénesis. Descartadas las hipótesis anteriores, se sugiere no solo que las melaninas juegan un papel en la comunicación visual sexual en ciertas avispas parasitoides, sino, lo más importante, que los machos de diferentes especies pueden haber evolucionado en la utilización de diferentes tipos de melaninas para modular el color de las manchas y rayas utilizadas durante el cortejo. Esto concuerda con la opinión de Rundell & Price (2009), donde destacaban que la pigmentación de la cutícula puede estar bajo selección sexual, lo que posiblemente afecte el aislamiento reproductivo y, a escala evolutiva, la especiación. En el **capítulo 4** se confirma que las melaninas son los pigmentos más abundantes en el patrón de color de la pubescencia de abejorros como sugería Hines (2008a) en sus estudios de TLC y HPLC/MS. Aquí se documenta, a diferencia del **capítulo 3**, que el color negro, el pigmento más común en abejorros, es atribuible a la mezcla de eumelanina y feomelanina. Este dato es muy interesante ya que sugiere que no es necesario producir una gama de pigmentos para diversificar sus patrones de color, el negro sería el color de referencia a partir del cual, dependiendo

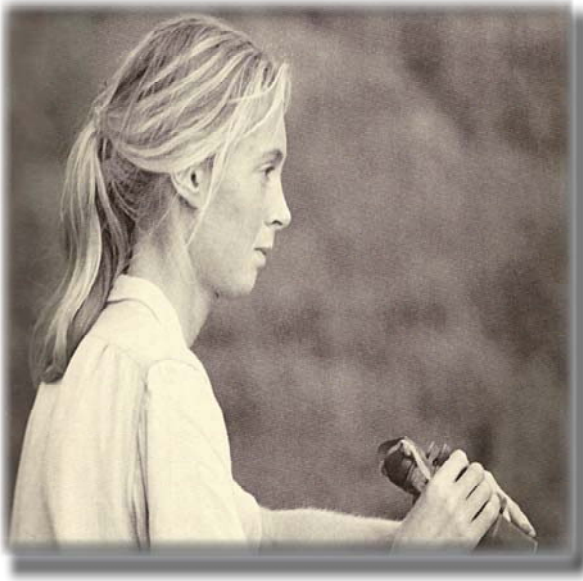
de su desaparición o reemplazamiento por feomelanina, se dieran el resto de colores más claros del género *Bombus* como amarillos, rojos, naranjas y marrones. El blanco sería la resultante de la ausencia de pigmento. Este hecho, como constatan Rapti *et al.* (2014) permitió a los abejorros diversificar rápidamente su patrón de color durante la radiación del género. Los resultados de los **capítulos 3 y 4** abren un nuevo horizonte de investigación sobre la pigmentación de la cutícula en Hymenoptera en unos casos con un marcado valor adaptativo en la reproducción cumpliendo un papel clave durante los despliegues de cortejo y en la competencia entre machos de Pteromalidae y en otros, como en los abejorros, asociada a funciones adaptativas como protección frente a la radiación UV, absorción de radiación solar, termoregulación y/o asociada al estrés oxidativo íntimamente vinculado a los costes en la producción de feomelanina y que podrían explicar las variaciones en los gradientes latitudinales de sus patrones de color. Es por todo ello que se sustenta el orden Hymenoptera, siendo consumidores primarios, como un nuevo modelo ecofisiológico en los que se abordarían estudios edafológicos y climáticos para esclarecer la bioquímica de la pigmentación animal.

Siguiendo con el propósito de colegir hipótesis ecomorfológicas en estructuras concretas de la cutícula de los himenópteros, las antenas son los principales apéndices sensoriales al disponer de una gran variedad de estructuras cuticulares, las sensilas, que de acuerdo con Wcislo (1995), Galvani *et al.*(2012) y Fialho *et al.* (2014) están involucradas en detectar estímulos químicos, mecánicos, térmicos y otros, desempeñando un papel central en actividades críticas como la alimentación y el reconocimiento intra e interespecifico conforme se documenta en los trabajos de Spaethe *et al.* (2007) y Riveros & Gronenberg (2010). En los **capítulos 5 y 6** se ha analizado cómo la variación de algunos rasgos clave de los ciclos vitales, como el uso del recurso trófico y las relaciones intersexuales, han contribuido en la morfología y evolución del equipamiento sensorial del orden Hymenoptera. El **capítulo 5** analiza el

equipamiento sensorial antenal de machos en la superfamilia Cynipoidea al que se han agregado los datos de un trabajo referente exclusivamente a hembras (Polidori & Nieves Aldrey, 2014). El trabajo muestra que el equipo sensorial antenal de machos es muy parecido al de las hembras ya que ambos sexos compartieron entre el 40%-100% de los tipos sensilares independientemente de su biología. Se identificaron ocho tipos morfológicos de sensilas (placoidea (SP), celocónica (SCo-A), campaniforme (SCa), basicónica (SB) y tricoidea (ST-A, ST-B, ST-C, ST-D)), y tanto el número como la disposición de las estas varían enormemente entre y dentro de los linajes estudiados, con un limitado efecto de la filogenia en esta variación. Cuando se analizan conjuntamente las 27 especies de las que se disponían de ejemplares de ambos sexos se puede apuntar que rara vez machos y hembras de la misma especie comparten todos los tipos sensilares. Por ejemplo, en las antenas de los machos de *Trichogramma australicum* (Girault, 1912) se han encontrado dos tipos de sensilas ST que no están presentes en la hembra, sugiriéndose que pudieran estar relacionadas con el comportamiento de cortejo según Amornsak *et al.* (1998). Los machos generalmente poseen un menor número de tipos sensilares que las hembras, siendo más conspicua la diferencia en inductores de agallas (comparado con especies que no forman agallas) lo que parecería apuntar a un mayor desarrollo del equipo sensorial como solución a actividades excepcionalmente propias de las hembras como el reconocimiento de la planta para la puesta de huevos. La variabilidad más clara con respecto al dimorfismo sexual se observó en el número de sensilas SP, donde los machos pueden llegar a tener hasta 5 veces más que las hembras en linajes parasitoides pudiendo inferir que esta disposición pudiera ser una presión selectiva determinante para el reconocimiento de pareja. Aunque se ha observado que en el conjunto de "Terebrantia" se pueden encontrar linajes donde las hembras tienen más sensilas SP que los machos, hecho que nos llevaría a plantear que la diversidad de los anfitriones como la especialización dirigida a la biología del huésped (por ejemplo, oculto vs no oculto) puede ser causante, al menos parcialmente, de esta variación.

Todos estos resultados sugieren que para confirmar la hipótesis ecomorfológica planteada es necesario la revisión del ancestro común.

En el **capítulo 6** se analiza la morfología externa del equipo sensorial en hembras de diferentes familias de Apoidea especializadas en el uso del polen para su alimentación o la de su prole. Se confirman los datos ya publicados, de la existencia de ocho diferentes tipos de sensilas caracterizadas por Galvani *et al.* (2012) y Queiroz Fialho *et al.* (2014). En este estudio ecomorfológico se documenta que tanto las sensilas ST-A como las sensilas SP son las más abundantes en las antenas de las abejas, las primeras involucradas en procesos de interacción social (nótese una pérdida de función de esta tipología sensilar en Cynipoidea, **capítulo 5**, típicamente integrada por especies solitarias) y las segundas con funciones de detección de sustancias químicas volátiles de sus plantas nutricias. Se analizaron las posibles diferencias entre las sensilas SP de especies oligoléticas y poliléticas, no encontrándose evidencias, ya que tanto el número como la densidad no variaron con respecto a las diferentes estrategias de vida. Sin embargo, se verifica una hipótesis ecomorfológica en las especies oligoléticas con una mayor densidad de sensilas ST-A que las especies poliléticas, lo que podría sugerir, además de lo mencionado anteriormente, que este tipo sensilar pueda estar relacionado con el reconocimiento de la planta en especies especialistas. En el estudio del **capítulo 5** dada la complejidad del grupo en cuanto al recurso trófico no se pudo atribuir ninguna tipología en concreto.



*"Lo mínimo que puedo hacer es hablar
por aquellos que no pueden hacerlo por sí
mismos".*

Jane Goodall

VII

Conclusiones generales

Las conclusiones más relevantes del trabajo recogido en esta memoria se resumen a continuación:

1. El desarrollo de tecnologías no destructivas como la Energía Dispersiva de Rayos X y la Cátodoluminiscencia acopladas a un Microscopio Electrónico de Barrido permiten el estudio de la composición estructural y química de la cutícula de insectos. La cutícula de las mandíbulas de himenópteros que presentan un porcentaje de cinc < 5% registró un centro luminiscente en la región del espectro visible asociado a enlaces C-C. El cambio estructural importante se produce cuando el cinc se sitúa en valores 5-20% en peso donde se registran dos centros luminiscentes específicos en la región del espectro ultravioleta. Uno de estos centros se asocia a enlaces de tipo O-Zn-O, Zn-Cl y Zn-O y el otro con grupos OH. Este método abre la posibilidad de abordar futuros trabajos en biomineralización, ecomorfología y estudios de cambio climático en insectos al poder emplear ejemplares de Colecciones de Historia Natural.
2. Los resultados obtenidos del enriquecimiento de cinc por Energía Dispersiva de Rayos X de las mandíbulas de 96 especies de himenópteros han confirmado que en las especies de las tres superfamilias de "Symphyta" analizadas no se presentan este rasgo y, sin embargo, en Apocrita ("Terebrantia" + Aculeata), representa una especialización muy variable, con familias donde no hay presencia del metal y familias con un amplísimo intervalo que abarca desde el 1% al 32% en peso de cinc y con un claro efecto filogenético solo en algunos linajes. No se ha podido constatar en este trabajo que el enriquecimiento de cinc sea un factor ecomorfológico vinculado a sus estrategias de vida estudiadas. Posiblemente otras historias de vida no

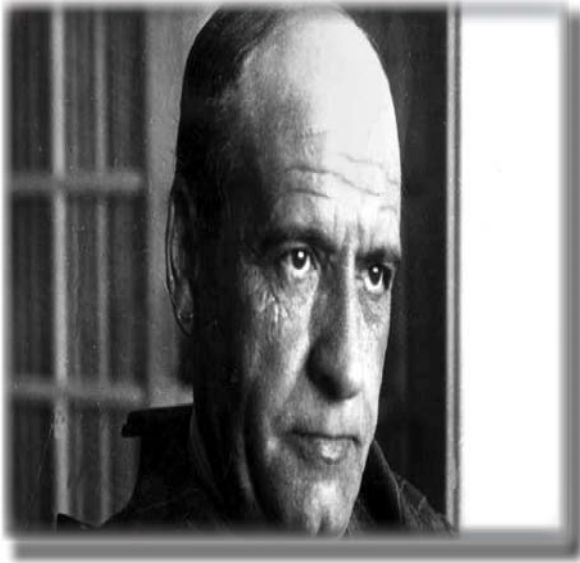
investigadas aquí puedan haber jugado un papel en la conformación de la estructura mandibular de los himenópteros.

3. Por primera vez, se ha desarrollado un procedimiento basado en la Espectroscopía Raman que permite la detección e identificación molecular de melaninas en la pigmentación de cinco especies de la familia Pteromalidae. Se ha determinado que la mayor parte de su pigmentación es debida a la presencia de dos tipos de melaninas, concretamente de eumelanina y feomelanina. La identificación de feomelanina ha sido muy interesante ya que su síntesis representa un coste mayor que la producción de eumelanina y, como consecuencia, se puede concluir que esta estrategia vital debe beneficiar al éxito reproductivo. Estos resultados apuntalan la hipótesis de que la especialización en el patrón de color observado en patas y antenas, únicamente en los machos de estas especies, representan caracteres sexuales secundarios, que exhiben durante el cortejo en la elección de la hembra y apuntan a que la regulación del tipo y/o proporción de melaninas, como estrategia de vida en himenópteros, puedan funcionar como señales honestas, como ocurre en ciertas aves.
4. Los análisis Raman, realizados sobre la pigmentación del género *Bombus*, mostraron que la mayor parte de los patrones de color encontrados en su pubescencia dependen en gran medida de las melaninas. El color negro, formado por la mezcla de eumelanina y feomelanina, se propone como el color básico a partir del cual, dependiendo de los niveles, propiedades ópticas y vibracionales de la feomelanina, se pueden formar el resto de colores, excepto el amarillo y el blanco. Los resultados obtenidos han permitido confirmar, con las filogenias más recientes del grupo, que el uso de ambos tipos de

melaninas es antiguo en el género. Este trabajo abre puertas a nuevos estudios ecomorfológicos donde se pueden relacionar los niveles de feomelanina con la melanización, la temperatura y el estrés oxidativo en este nuevo modelo animal que ayudaría a entender la gran variación de los patrones de color en el orden Hymenoptera como estrategia de vida a lo largo de los gradientes latitudinales.

5. El estudio comparativo por Microscopía Electrónica de Barrido de la morfología antenal de los machos de Cynipoidea completan el trabajo ecomorfológico más minucioso sobre el equipamiento sensorial de himenópteros. Los datos de ambos sexos suscitan, en primer lugar, que el equipo sensorial en machos y en hembras es muy parecido en cuanto a los diferentes tipos de sensilas caracterizadas. En segundo lugar, los datos cuantitativos confirman que los machos necesitan un menor número de sensilas que las hembras y, en tercer lugar, se concluye que únicamente la sensila SP aparece siempre en mayor número en machos que en hembras alcanzando la máxima diferencia cuando se comparan en individuos inductores de agallas. Estos resultados apoyan la teoría de que las hembras de cinípidos desarrollan un equipamiento sensorial más rico para responder a actividades especializadas propias como la puesta de los huevos y el que los machos poseen una mayor densidad de sensilas SP, como estrategia de vida para el reconocimiento de pareja.
6. Los resultados mediante el SEM del equipamiento sensorial en la familia Apoidea sugieren que no hay diferencias significativas de morfología entre especies oligolécticas y polilécticas. Los datos analizados muestran que para ambos grupos existe una correlación positiva entre el ancho de la cabeza y el número de sensilas SP. Las abejas oligolécticas poseen una mayor densidad de sensilas ST-A que las polilécticas, por lo que se plantea que este tipo

sensorial, además de ser importante en las interacciones sociales, lo sea también para la sensibilidad olfativa especializada en el reconocimiento de la planta hospedadora.



*"Nuestras convicciones más arraigadas,
más indubitables, son las más
sospechosas.
Ellas constituyen nuestro límite,
nuestros
confines, nuestra prisión".*

Ortega y Gasset

VIII

Posibles desarrollos futuros

Como se comentaba en el resumen, esta tesis doctoral ha sido concebida para dar un aporte significativo al conocimiento, desde un enfoque comparativo, de las relaciones entre morfología, fisiología y ecología en los himenópteros. Pero también representa el proemio de lo que se espera que en el futuro se convierta en una línea de investigación sólida, consolidada sobre el estudio de patrones ecomorfológicos en el orden Hymenoptera, utilizando mayormente técnicas analíticas no destructivas que coadyuvan con los cada vez más numerosos y diversos estudios científicos sobre ejemplares que provienen de colecciones de historia natural.

a. **Fluorescencia en el patrón de color de la cutícula en Hymenoptera.**

Existe un estudio sobre arañas, un grupo de artrópodos rico y ecológicamente diverso, que ha revelado una variabilidad en algunas de sus familias en el número y tipo de fluorocromos presentes en su cutícula. El trabajo documenta que muchas de las familias de arañas analizadas fluorescen en longitudes de onda UV y azul, visibles para sus depredadores y presas (aves e insectos), por lo que la selección natural impuesta por las interacciones depredador-presa han podido conducir a la evolución de la fluorescencia en arañas (Kindra *et al.*, 2007). También se conoce que todas las especies conocidas de escorpiones tienen cutículas que fluorescen, lo que sugiere que la fluorescencia puede no jugar una función exclusivamente ecológica (Fasel *et al.*, 1997; Frost *et al.*, 2001). El estudio de la fluorescencia de insectos ha sido considerablemente menos exhaustivo que en otros grupos y aunque hay estudios que datan de los años cincuenta del pasado siglo, la mayor parte de los estudios cuantitativos han sido mucho más recientes. Israelowitz *et al.* (2007), propusieron un estudio de fluorescencia en Coleoptera (*Melanophila acuminata* De Geer, 1774) y Vigneron *et al.* (2008) estudiaron la fluorescencia en el orden Lepidoptera (*Troïdes magellanus* Felder, 1862)).

Los estudios químicos dignos de mención sobre fluorescencia en insectos incluyen los trabajos de Umebachi & Yoshida (1970) y Umebachi (1985) donde se documenta que la pigmentación en las alas de algunas especies de mariposas (del género *Papilio* Linnaeus, 1758) es debida a la presencia de papiliocromos y los trabajos de Tabata *et al.* (1996) y Kumazawa & Tabata (2001) donde pudieron documentar la presencia de biopterina, pterina e isoxantopterina en la producción de fluorescencia en dos especies de mariposas (*Morpho adonis* Cramer, 1775 y *Morpho sulkowskyi* Kollar, 1850).

Dentro del orden Hymenoptera se sabe que el exoesqueleto de la avispa oriental (*Vespa orientalis* Linnaeus 1771) exhibe un patrón marrón-amarillo. Los segmentos amarillos protegen a la cutícula de la radiación solar UV potencialmente dañina y contienen gránulos de xantopterina (Plotkin *et al.*, 2009b) mientras que los segmentos marrones contienen gránulos de melanina (Plotkin *et al.*, 2010). También se valoró la presencia de pterinas cuyo papel clave en fotorrecepción y fototransducción de luz azul y ultravioleta cercano la hacen de este un pigmento posiblemente implicado en la absorción de parte de la radiación solar dentro de la cutícula. Nuestras propias aproximaciones anticipan que algunas familias del orden Hymenoptera presentan un patrón fluorescente, al igual que las arañas, en longitudes de onda de emisión azul y cercanos al UV.

Como se ha visto en dos artículos de esta memoria, la utilización de pigmentos es frecuente en el orden Hymenoptera. En este sentido esta tesis ha puesto en valor como la espectroscopía Raman es capaz de ayudar en la identificación y caracterización de pigmentos responsables del color de algunos linajes dentro del orden. Sin duda uno de los avances más interesantes de esta tesis ha sido la innovación en las diferentes metodologías aplicadas y sus sinergias. Bajo esta premisa, se propone un estudio complementario mediante espectroscopía Raman y CLSM (Confocal Laser Spectral Microscopy), otra técnica no destructiva, donde se

identificarán los posibles y diferentes fluoróforos en función de sus máximos de emisión y su intensidad, se intentarán identificar a través de su estructura molecular para analizar, desde un punto de vista ecomorfológico, la variabilidad de esta respuesta en el orden, su carácter evolutivo y su importancia para la señalización intraespecífica e interespecífica.

b. Tamaño y morfología del sistema visual en avispas de las familias Crabronidae y Sphecidae.

A pesar del creciente conocimiento sobre las estrategias de vida en el orden Hymenoptera, todavía sabemos poco sobre las señales involucradas, la relación emisor-receptor y las adaptaciones funcionales de los sistemas sensoriales involucrados. Hay diferentes trabajos en la literatura que han demostrado que el tamaño y la morfología (número de omatidios, forma del ojo, tamaño del ocelo) varía en las abejas en función del período de aprovisionamiento (pleno día o amanecer/atardecer) (Somanathan *et al.*, 2009) o en el apareamiento de abejorros (intensidad de luz/ tiempos de vuelo) (Streinzer *et al.*, 2013a).

Nada se sabe sobre las posibles adaptaciones funcionales en los ojos y ocelos de las avispas depredadoras en función del tipo de presa (muy móviles y voladoras o poco móviles y no voladoras) o en función del tipo de comportamiento de los machos a la hora de buscar las hembras (territoriales o no territoriales). En ambos casos puede haber un efecto sobre el sistema visual ya que los estímulos visuales cambian.

Hasta ahora la metodología utilizada era la de realizar réplicas con lacas de las facetas oculares obteniendo moldes en 2D. Esta técnica es inviable en microhimenópteros por lo que nos proponemos implementar una nueva metodología mediante CLSM que nos permita realizar estudios tridimensionales de sus facetas para identificar adaptaciones oculares (ojos más grandes, mayor número de omatidios, facetas ampliadas) y de los ocelos (tamaño y posición) y así analizar posibles hipótesis

ecomorfológicas dentro de las familias de avispas depredadoras (Crabronidae y Sphecidae).

c. Tomografía computerizada de Rayos X (micro-CT) para el estudio de la cutícula del orden Hymenoptera.

Cada vez son más los trabajos de entomología o zoología de invertebrados que utilizan micro-CT. Postnov *et al.* (2002) fueron aparentemente los primeros en usar la técnica para invertebrados, donde obtuvieron imágenes transversales de caracoles vivos y reconstrucción de imágenes en 3D de las conchas de caracol. Más recientemente, Tarver *et al.* (2006) utilizaron un micro-CT para observar semillas de frijol caupí (*Vigna unguiculata* Linneo, Walp 1842), infestadas de gorgojos del frijol caupí (*Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775.) (Coleoptera: Chrysomelidae) y obtuvieron imágenes claras del daño de alimentación interno causado por las larvas.

En el orden Hymenoptera los estudios microtomográficos han servido, por ejemplo, para determinar el origen del alargamiento de la espina pronotal como consecuencia del alargamiento del músculo del cuello en el género hiperdiverso de hormigas *Pheidole* (Westwood, 1839) (Hymenoptera: Formicidae). Los resultados arrojan luz sobre las consecuencias que la formación de estas estructuras cuticulares tiene en la estrategia de búsqueda de alimento, la estrategia defensiva, la especialización ecológica y la biomecánica (Eli *et al.*, 2017).

También se ha utilizado en un estudio para distinguir en *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) la ubicación de la quitina sana de la desnaturalizada o quitina químicamente dañada. La quitina desnaturalizada se asocia con desacetilación, pérdida de cristalinidad, hinchamiento hidrofílico, oxidación, despolimerización de Schweiger y formación de sales de hidrocioruro. Los resultados mediante imágenes de Rayos X utilizando contraste con nitrato de plata fueron alentadores para identificar y

clasificar los potenciales agentes ambientales que provocan la desnaturalización de la quitina sin destruirla. (Butzloff, 2011).

Un estudio que utilizaba micro-CT ha permitido identificar en fósiles de *Megachile* (Litomegachile) *gentilis* (Cresson, 1872) y hojas de dicotiledóneas utilizadas para la construcción del nido, algunas de las complejas interacciones entre insecto-planta además de posteriores inferencias paleoambientales (Holden *et al.*, 2014).

En otros estudios recientes estudios el micro CT ha sido utilizado para comparar la morfología del sistema bucal tanto en las estructuras que componen la probóscide (glosa, galea y palpos labiales) de las abejas de orquídeas neotropicales (Euglossini: Apidae) como en la musculatura mandibular de *Vespula germánica* (Fabricius, 1793) (Vespidae). El primero ha permitido dilucidar los mecanismos y movimientos de alimentación para captar el néctar de las flores y sus costes y/o beneficios en la evolución de la longitud del canal de alimentación (Düster *et al.*, 2018) y el segundo para demostrar un dimorfismo sexual en la fuerza en la mordida (Baranek *et al.*, 2018).

Nosotros pretendemos mediante imágenes de Rayos X y reconstrucción 3D, realizar un estudio de la variabilidad en el grosor de la cutícula de diferentes linajes del orden Hymenoptera que utilizan distintas estrategias de vida con el propósito de comprender mejor las causas y las consecuencias de dicha variabilidad y utilizando datos filogenéticos, morfométricos y ecológicos.

d. Morfología del calcar en las patas de los Cynipoidea.

El calcar es una estructura exclusiva en el orden Hymenoptera que se encuentra en las patas delanteras y que se utiliza para la limpieza de las antenas. Es una estructura muy importante a nivel funcional, ya que recientemente se ha demostrado que las antenas que no están constantemente limpias pierden buena parte de su sensibilidad olfativa (Böröczky *et al.*, 2013). El calcar ha sido estudiado de forma preliminar dentro de los himenópteros como orden (Basibuyuk *et al.*, 1995), pero no existen casi

estudios sobre su variabilidad dentro de los diferentes linajes. Además, en el referido estudio el análisis se hizo a nivel de familia, no de especie.

En este contexto y desde el grupo de investigación de los directores del doctorando se ha concluido la codificación y análisis del calcar entre taxones de la superfamilia de Cynipoidea a partir de 500 microfotografías de las patas anteriores de los machos tomadas mediante SEM, y los resultados muestran cierta variabilidad para sustentar una hipótesis ecomorfológica.

e. Estudio ecomorfológico de las estructuras de liberación y diseminación de feromonas (RSS) en la familia Cynipidae.

El contacto antenal de los machos de himenópteros parasitoides ha demostrado ser crucial para el apareamiento exitoso al permitir la transferencia de feromonas sexuales "específicas de especie" secretadas por unas estructuras glandulares situadas en la superficie externa del tercer antenómero modificado (A3) de las antenas del macho (Bin *et al.*, 1999; Isidoro y Bin, 1995; Isidoro *et al.*, 1999; Romani *et al.*, 2005, 2008). Estas áreas antenales sexualmente dimórficas, denominadas "tiloides", muestran una gran variabilidad y pueden aparecer ya sea como regiones excavadas lateralmente o placas elevadas tanto elípticas como lineales que contienen poros. De acuerdo con Isidoro *et al.* (1996) estas áreas se denominan "estructuras de liberación y diseminación" (RSS), debido a una posible doble función, por un lado, "liberan" la secreción de la glándula a través de los poros y, por otro, "diseminan" la secreción sobre la/s sensila/s apropiada/s de las antenas de la hembra. La posición relativa, el número, la forma y el tamaño de estas estructuras pueden ser utilizados como caracteres descriptivos, e incluso diagnósticos de especies, representando un carácter taxonómico importante (Townes, 1970; Gauld y Bolton, 1988; Quicke, *et al.*, 1997).

El tamaño pequeño y la simplicidad de estas estructuras también presentes en las avispas de las agallas (Cynipidae) todavía no han sido objeto de un detallado estudio comparativo. Se pretende en primer lugar mediante SEM, caracterizar la

Posibles desarrollos futuros

diversidad y variabilidad de estos tiloides y sus poros en las antenas de los machos de la familia Cynipidae, y, en segundo, lugar evaluar posibles hipótesis ecomorfológicas en el sistema sensorial de los machos al correlacionar estos resultados con las diferentes estrategias de vida en la división Parasítica tanto en el reconocimiento intraespecífico y rastreamiento de rutas, como en el comportamiento de cortejo que probablemente facilite la transferencia de la feromona de contacto.



*“Una vez que empezamos a ver
debemos buscar fuerzas para ver más,
no menos”.*

Arthur Miller

IX

Abreviaturas

Abreviaturas

3D:	Tridimensional
λ:	Lambda
μm:	Micrómetro
A:	Amperios
Å:	Amstrongs
Au:	Oro
ΔE:	Incremento de energía
BSED:	Detector de electrones retrodispersados
c:	Constante de la luz.
C:	Carbono
°C:	Grados centígrados
Ca^{2+}:	Ion calcio
CaF_2:	Fluoruro de calcio
CCD:	Dispositivo de Carga Acoplada
Ce^{3+}:	Ion cerio
CETAF:	Consortio de Instituciones Europeas de Taxonomía
CHN:	Colecciones de Historia Natural
Cl:	Cloro
CL:	Cátodoluminiscencia
cm^2:	Centímetros cuadrados
Co^{2+}:	Ion cobalto
Cu:	Cobre
E_0:	Estado basal de energía
E_1:	Estado excitado de energía
EDS:	Energía Dispersiva de Rayos X
E_g:	Energía de la banda fundamental
Ev:	Electrón voltio
E_{vib}:	Energía vibracional
Fe:	Hierro

Fe²⁺:	Ion ferroso
Fe³⁺:	Ion férrico
Fig.:	Figura
Figs.:	Figuras
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
h:	Constante de Planck
h u:	Energía del fotón
h u´:	Energía del fotón´
h u_f:	Energía del fonón
IR:	Infrarrojo
°K:	Grados Kelvin
KBr:	Bromuro potásico
keV:	Kilo electrón voltio
kV:	Kilovoltios
LFD:	Detector de electrones secundarios
Li:	Litio
lp/mm:	Pares de líneas por milímetro
M:	Molar
mA:	Miliamperios
ME:	Microscopía Estereoscópica
Mg²⁺:	Ion magnesio
mm:	Milímetros
Mn:	Manganeso
Mn²⁺:	Ion manganeso
MNCN:	Museo Nacional de Ciencias Naturales
MS:	Espectrometría de masas
MVP:	Mínimos Variables de Población.
NaCO₃	Carbonato sódico
Ni²⁺:	Ion níquel
NIR:	Infrarrojo cercano
nm:	Nanómetros

O:	Oxígeno
OH:	Grupos hidroxilo
p.ej.	Por ejemplo
Pb²⁺:	Ion plomo
PMT:	Fotomultiplicador
ppm:	Partes por millón
rpm:	Revoluciones por minuto
SB:	Sensila basicónica
SCa:	Sensila campaniforme
SCo:	Sensila celocónica
SE:	Servicios Ecosistémicos
SEM:	Microscopía Electrónica de Barrido
Si:	Silicio
s.l.:	<i>sensu lato</i>
SP:	Sensila placoidea
spp:	Especies
s.str.:	<i>sensu stricto</i>
ST:	Sensila tricoidea
TLC:	Cromatografía en capa fina
UCM:	Universidad complutense de Madrid
UCME:	Colección de Entomología de la Universidad Complutense de Madrid
UV:	Ultravioleta
v:	Frecuencia debida a la dispersión de la luz
v₀:	Frecuencia de luz incidente
ṽ:	Número de onda
v_r:	Frecuencia Raman
%wt:	porcentaje en peso
Z:	Número atómico
ZAF:	Correcciones matriciales basadas en las diferencias en el número atómico, la absorción de rayos X y en la producción de Rayos X secundarios o fluorescencia de Rayos X

Zn:

Cinc



*“Equipado con sus cinco sentidos, el
hombre explora el universo a su
alrededor y a esa aventura la llama
ciencia”.*

Edwin P. Hubble.

X

Referencias bibliográficas

- **Abram, P.K., Guerra-Grenier, E., Després-Einspennner, M.L., Ito, S., Wakamatsu, K., Boivin, G., & Brodeur, J. (2015).** An Insect with Selective Control of Egg Coloration. *Current Biology*, 25, 2007-2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.010>.
- **Ács, Z., Challis, R., Bihari, P., Penzes, Z., Blaxter, M., Hayward, A., Melika, G., Csóka, G., Péntzes, Z., Pujade-Villar, J., Nieves-Aldrey, J.L., Schönrogge, K., & Stone, G.N. (2010).** Phylogeny and DNA Barcoding of Inquiline Oak Gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palaearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55, 210-225
- **Ågren, L. (1977).** Flagellar sensilla of some colletidae (Hymenoptera: Apoidea). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 6, 137–146
- **Ågren, L. (1978).** Flagellar sensilla of two species of *Andrena* (Hymenoptera: Andrena). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 7, 73–79.
- **Ågren, L. (1989).** Flagellar sensillum patterns in Nyssoninae and Philanthinae wasps (Hymenoptera, Sphecidae). *Zoologica Scripta*, 18, 527–535.
- **Ågren, L., & Hallberg, E. (1996).** Flagellar sensilla of bumble bee males (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*). *Apidologie*, 27: 433–444. Ågren 1977
- **Ågren, L., & Svensson, B.G. (1982).** Flagellar sensilla of Sphecodes bees (Hymenoptera, Halictidae). *Zoologica Scripta*, 11, 45–54
- **Agresti, A. (2010).** *Analysis of Ordinal Categorical Data*, 2nd edition. New York: Wiley. 424 pp.
- **Aguiar, A., Deans, A., Engel, M., Forshage, M., Huber, J., Jennings, J., Johnson, J., Arkady S., Lelej, A., Longino, J., Lohrmann, V., Mikó, I., Michael Ohl, M., Rasmussen, C., Taeger, A., & Yu, D. (2013).** *Order Hymenoptera*. In: Zhang, Z.Q. (Ed.) *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness* (Addenda 2013). *Zootaxa*, 3703, 51-62. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3703.1.12>.
- **Ahmed, T., Zhang, T.T., Wang, Z.Y., He, K.L., & Bai, S.X. (2013).** Morphology and ultrastructure of antennal sensilla of *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae) and their probable functions. *Micron*, 50, 35–43.
- **Akkari, N., & Enghoff, H. (2011).** On some surface structures of potential taxonomic importance in families of the suborders Polydesmidea and Dalodesmidea (Polydesmida, Diplopoda). *ZooKeys*, 156, 1–24. doi: 10.3897/zookeys.156.2134
- **Akkari, N., & Enghoff, H. (2012).** Review of the genus *Ommatoiulus* in Andalusia, Spain (Diplopoda: Julida) with description of ten new species and notes on a remarkable gonopod structure, the fovea.

- Zootaxa*, 3538, 1-53.
- **Al-Beidh, S., Dunn, D.W., & Cook J.M. (2012).** Spatial stratification of internally and externally non-pollinating fig wasps and their effects on pollinator and seed abundance in *Ficus burkei*. *International Scholarly Research Notices: Zoology*, Article ID 908560, 1-6.
 - **Altner, H. (1977).** Insect sensillum specificity and structure: an approach to a new typology. *Olfaction and Taste*, 6, 295–303.
 - **Altner, H., & Prillinger, L. (1980).** Ultrastructure of invertebrate chemothermo, and hygroreceptors and its functional significance. *International Review of Cytology*, 67, 69–139.
 - **Amornsak, W., Cribb, B., & Gordh, G. (1998).** External morphology of antennal sensilla of *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera: *Trichogrammatidae*). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 27, 67–82.
 - **Andersen, S.O. (1979).** Biochemistry of the insect cuticle. *Annual Review of Entomology*, 24, 29-59.
 - **Andersen, S.O. (2010).** Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 166-178.
 - **Andersen, S.O., Peter, M.G., & Roepstorff, P. (1996).** Cuticular sclerotization in insects. *Comparative and Biochemical Physiology*, B 113, 689e705.
 - **Andersson, M. (1994).** *Sexual Selection*. Princeton University Press, Princeton.
 - **Archie, J.M. (1985).** Methods for Coding Variable Morphological Features for Numerical Taxonomic Analysis. *Systematic Biology*, 34, (3), 326–345, <https://doi.org/10.1093/sysbio/34.3.326>
 - **Askew, R.R. (1961a).** On the biology of the inhabitants of oak galls of Cynipidae (Hymenoptera) in Britain. *Transactions of the Society for British Entomology*, 14, 237-268.
 - **Askew, R.R. (1961b).** A study of the biology of species of the genus *Mesopolobus* Westwood (hymenoptera: pteromalidae) associated with cynipid galls on oak. *Ecological Entomology*, 113 (8), 155-173.
 - **Askew, R.R. (1971).** *Parasitic Insects*. Heinemann, London.
 - **Askew, R.R. (1980).** The Diversity of Insect Communities in Leafmines and Plant Galls. *Journal of Animal Ecology*, 49 (3), 817-829
 - **Askew, R.R. (1984).** *The biology of gall wasps*. In Ananthakrishnamn TN, editor. *Biology of Gall Insects*. London: Hodder Arnold H&S. pp 223-271.
 - **Askew, R.R., Melika, G., Pujade-Villar, J., Schonrogge, K., Stone, G.N., & Nieves-Aldrey, J.L. (2013).** *Catalogue of parasitoids and inquilines in cynipid oak galls in the West Palaearctic*. *Zootaxa*, 3643, 1-133.

- **Askew, R.R., Plantard, O., Gómez, J.F., Nieves, M.H., & Nieves-Aldrey, J.L. (2006).** Catalogue of parasitoids and inquilines in galls of Aylacini, Diplolepidini and Pediaspidini (Hymenoptera: Cynipidae) in the West Palaeartic. *Zootaxa*, 1301, 1-60.
- **Askew, R.R., & Shaw, M.R. (1986).** *Parasitoid communities: their size, structure and development*. In Waage, J. & D. Greathead. *Insect Parasitoids*. Academic Press. London. pp 225–264.
- **Assem, J.V.D. (1974).** Male courtship patterns and female receptivity signal of Pteromalinae (Hymenoptera, Pteromalidae), with a consideration of some evolutionary trends and a comment on the taxonomic position of *Pachycrepoideus vindemiae*. *The Netherlands Journal of Zoology*, 24, 253–278.
- **Austin, A.D. & Downton, M. (Eds). (2000).** *The Hymenoptera: Evolution, Biodiversity & Biological Control*. CSIRO Publishing, Melbourne.
- **Azevedo, D.O., Matiello-Guss, C.P., Rönnau, M., Zanuncio, J.C., & Serrão, J.E. (2008).** Post-embryonic development of the antennal sensilla in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Meliponini). *Microscopy Research and Technique*, 71 (3), 196-200
- **Babiy, P.P. (1925).** Neues zum Hummelproblem. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 125, 502-512.
- **Bagnall, D.M., Chen, Y.F., Shen, M.Y., Zhu, Z., Goto, T., & Yao, T. (1998).** Room temperature excitonic stimulated emission from zinc oxide epilayers grown by plasma-assisted MBE. *Journal of Crystal Growth*, 184/185, 605-609.
- **Bailey, R., Schönrogge, K., Cook, J., & Melika, G. (2009).** Host niches and defensive extended phenotypes structure parasitoid wasp communities. *PLoS Biology*, 7:e1000179.
- **Baranek, B., Kuba, K., Bauder, J.A.S., & Krenn, H.W. (2018).** Mouthpart dimorphism in male and female wasps of *Vespula vulgaris* and *Vespula germanica* (Vespidae, Hymenoptera). *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 65, (1), 65-74. <https://doi.org/10.3897/dez.65.23593>
- **Barbin, V. (2013).** Application of cathodoluminescence microscopy to Recent and past biological materials: a decade of progress. *Mineralogy and Petrology*, 107, 353-362.
- **Barbosa, A. & Moreno, E. (1994).** Convergence in aerially feeding insectivorous birds. *Netherlands Journal of Zoology*, 45, (3-4), 291-304.
- **Baronnet, A., Cuif, J.P., Dauphin, Y., Farre, B., & Nouet, J. (2008).** Crystallization of biogenic Ca-carbonate within organo-mineral micro-domains. Structure of the calcite prisms of the Pelecypod *Pinctada margaritifera* (Mollusca) at the submicron to nanometre ranges. *Mineralogical Magazine*, 72, 617-626.

- **Basibuyuk, H. H., & Quicke, D.L.J. (1995).** Morphology of the antennal cleaner in the Hymenoptera with particular reference to non-aculeate families (Insecta). *Zoologica Scripta*, 24, 157-177.
- **Basibuyuk, H.H., & Quicke, D.L.J. (1999).** Gross morphology of multiporous plate sensilla in the Hymenoptera (Insecta). *Zoologica Scripta*, 28, 51–67.
- **Basibuyuk, H.H., Quicke, D.L.J., Rasnitsyn, A.P., & Fitton, M.G. (2000).** Morphology and sensilla of the Orbicula, a sclerite between the tarsal claws, in the Hymenoptera. *Annals of the Entomological Society of America*, 93, 625–636.
- **Bearhop, S., & Inger, R. (2008).** Applications of stable isotope analyses to avian ecology. *The Ibis: Journal of the British Ornithologists' Union*, 150(3), 447-461.
- **Bennett, A. (1987).** *Interindividual variability: An underutilized resource.* In: *New Directions in Ecological Physiology*, (eds M.E. Feder, a.F. Bennett, W.W. Burggren & R.B. Huey). pp 147-169. Cambridge University Press, Cambridge.
- **Bennett, A.T.D., & Thery, M. (2007).** Avian color vision and coloration: multidisciplinary evolutionary biology. *The American Naturalist*, 169, S1-S6. DOI: 10.1086/510163
- **Benson, R.B. (1943).** *Studies in Siricidae, especially of Europe and southern Asia (Hymenoptera; Symphyta).* *Bulletin of Entomological Research*, 34, 27-51.
- **Betz, O. (2002).** Performance and adaptive value of tarsal morphology in rove beetles of the genus *Stenus* (Coleoptera, Staphylinidae). *Journal of Experimental Biology*, 205 (8), 1097-1113.
- **Beutel, R., & Haas, A. (1998).** Larval head morphology of *Hydroscapha natans* (Coleoptera, Myxophaga) with reference to miniaturization and the systematic position of Hydroscaphidae. *Zoomorphology*, 118(2), 103-116.
- **Beutel, R., Friedrich, F., Hörnschemeyer, T., Pohl, H., Hünefeld, F., Beckmann, F., Meier, R., Misof, B., Whiting, M.F., & Vilhelmsen, L. (2011).** Morphological and molecular evidence converge upon a robust phylogeny of the megadiverse Holometabola. *Cladistics the International Journal of the Willi Hennig Society*, 27(4), 341-355.
- **Birkedal, H., Khan, R.K., Slack, N., Broomell, C.C., Lichtenegger, H.C., Zok, F.W., Stucky, G.D., & Waite, J.H. (2006).** Halogenated veneers: protein cross-linking and halogenation in the jaws of a marine polychaete worm. *ChemBioChem*, 7, 1392-1399.
- **Bleeker, M.A.K., Smid, H.M., Van Aelst, A.C., Van Loon, J.J., & Vet, L.E. (2004).** Antennal sensilla of two parasitoid wasps: a comparative scanning electron microscopy study. *Microscopy Research and Technique*, 63, 266–273.

- **Blomquist, J.G., & Bagnères, A.G. (2010).** *Introduction, history and overview of insect hydrocarbons*. In: Blomquist, J.G. and Bagnères, A.G. (Eds), *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*. Cambridge, Cambridge University Press. pp 3-18
- **Boakes, E.H., McGowan, P.J.K., Fuller, R.A., Ding C.G, Clark, N.E., O'connor, K., & Georgina M. (2010).** Distorted Views of Biodiversity: Spatial and Temporal Bias in Species Occurrence Data. *PLoS Biology*, 8(6), E1000385.
- **Bock, W.J., & Von Wahlert, G. (1965).** Adaptation and the form-function complex. *Evolution*, 19, 269-299.
- **Boggs, S., & Krinsley, D. (2006).** *Application of cathodoluminescence imaging to the study of sedimentary rocks*. Cambridge: Cambridge University Press.
- **Bogusch, P., & Straka, J. (2012).** *Review and identification of the cuckoo bees of central Europe (Hymenoptera: Halictidae: Sphecodes)*. *Zootaxa*, 3311, 1-41.
- **Bohart, R., & Menke A. (1976).** *Sphecid Wasps of the World: a generic revision*. Berkeley, California, USA: University of California Press.
- **Boker, H. (1935-7).** *Verleichende biologische Anatomie der Wirbeltiere*. Jena, G. Fischer Verlag.
- **Borg, I., & Groenen, P.J.F. (2005).** *Modern multidimensional scaling: theory and applications* (2nd ed.). Springer, New York.
- **Böröczky, K., Wada-Katsumata, A., Batchelor, D., Zhukovskaya, M., & Schal, C. (2013).** **Insects groom their antennae to enhance olfactory acuity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences (USA)*, 110, 3615-3620
- **Bosch, J., & Vicens, N. (2002).** Body size as an estimator of production costs in a solitary bee. *Ecological Entomology*, 27, 129–137.
- **Bourdais, D., Vernon, P., Krespi, L., Le L.J., & Van Baaren J. (2006).** Antennal structure of male and female *Aphidius rhopalosiphi* DeStefani-Peres (Hymenoptera: Braconidae): description and morphological alterations after cold storage or heat exposure. *Microscopy Research and Technique*, 69, 1005–1013.
- **Braendle, C., Heyland, A., & Flatt, T. (2011).** *Integrating mechanistic and evolutionary analysis of life history variation*. In *Mechanism of Life History Evolution. The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-offs* (eds T. Flatt and A. Heyland). pp 3-10. Oxford University Press, Oxford.

- **Branstetter, M.G., Danforth, B.N., Pitts, J.P., Faircloth, B.C., Ward, P.S., Buffington, M.L., Gates, M.W., Kula, R.R., & Brady, S.G. (2017).** Phylogenomic Insights into the Evolution of Stinging Wasps and the Origins of Ants and Bees. *Current Biology*, 27(7), 1019-1025.
- **Brenner, M., & Hearing, V.J. (2008).** The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84, 539-549. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x.
- **Brooks, D., & McLennan, D.A. (2002).** *The nature of diversity: An evolutionary voyage of discovery.* University of Chicago Press. Chicago & London.
- **Broomell, C.C., Mattoni, M.A., Zok, F.W., & Waite, J.H. (2006).** Critical role of zinc in hardening of Nereis jaws. *Journal of Experimental Biology*, 209, 3219-3225.
- **Brothers, D. (1975).** Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to Mutillidae. *Dissertation Abstracts International*, 35(9), 4488.
- **Brothers, D.J. (1999).** Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoologica, Scripta*, 28, 233-249.
- **Brothers, D., & Carpenter, J. (1993).** Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research*, 2(1), 227-302.
- **Buffington, M.L. (2007).** The occurrence and phylogenetic implications of the ovipositor clip within the Figitidae (Insecta: Hymenoptera: Cynipoidea). *Journal of Natural History*, 41, 2267 - 2282.
- **Buffington, M.L., Brady, S.G., Morita, S.L., & Van Noort S. (2012).** Divergence estimates and early evolution of Figitidae (Hymenoptera: Cynipoidea). *Systematic Entomology*, 37, 287–304.
- **Buffington, M.L., Nylander, J.A.A., & Heraty, J.M. (2007).** The phylogeny and evolution of Figitidae (Hymenoptera: Cynipoidea). *Cladistics*, 23: 403-431.
- **Buffington, M.L., & Van Noort, S. (2012).** Revision of the Afrotropical *Oberthuerellinae* (Cynipoidea: Liopteridae). *Zookeys*, 202, 1–154.
- **Burger, H., Ayasse, M., Dötterl, S., Kreissl, S., & Galizia C.G. (2013).** Perception of floral volatiles involved in host-plant finding behaviour: comparison of a bee specialist and generalist. *The Journal of Comparative Physiology A*, 199, 751–761.
- **Burger, H., Ayasse, M., Häberlein, C.M., Schulz, S., & Dötterl, S. (2010a).** *Echium* and *Pontechium* specific floral cues for host-plant recognition by the oligolectic bee *Hoplitis adunca*. *South African Journal Botany*, 76, 788–795
- **Burger, H., Dötterl, S., & Ayasse, M. (2010b).** Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Functional Ecology*, 24, 1234–1240

- **Burger, H., Dötterl, S., Häberlein, C.M., Schulz, S., & Ayasse, M. (2012).** An arthropod deterrent attracts specialised bees to their host plants. *Oecologia*, 168, 727–736
- **Burt, W.H. (1930).** Adaptive modifications in the woodpeckers. *University California Publications Zoology*, 32, 455-524.
- **Butterfield, A., & Anderson, M. (1994).** Morphology and ultrastructure of antennal sensilla of the parasitoid *Trybliographa rapae* (Westw.) (Hymenoptera: Cynipidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 23, 11–20.
- **Butzloff, P.R. (2011).** Micro-CT imaging of denatured chitin by silver to explore honey bee and insect pathologies. *PLoS ONE*, 6 (11):e27448. doi:10.1371/journal.pone.0027448.
- **Camargo, R.S., Hastenreiter, I.N., Brugger, M., Forti, L.C., & Lopes, J.F.S. (2015).** Relationship between mandible morphology and leaf preference in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(2), 241-244.
- **Cameron, S.A., Hines, H.M., & Williams, P.H. (2007).** A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 91, 161-188. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2007.00784.x
- **Cardinal, S., & Danforth, B.N. (2013).** Bees diversified in the age of eudicots. *Proceedings Biological Sciences*, 280, 20122686.
- **Carpenter, J. (1986).** Cladistics of the chrysoidea (Hymenoptera). *Journal of the New York Entomological Society*, 94(3), 303-330.
- **Carrascal, L.M., Moreno, E., & Telleria, J.L. (1989).** Ecomorphological relationships in a group of insectivorous birds of temperate forests in winter. *Holarctic Ecology*, 13, 105-111.
- **Carvalho, W.J., Fujimura, P.T., Bonetti, A.M., Goulart, L.R., Cloonan, K., Da Silva, N.M., Borges Araújo, E.C., Ueira-Vieira, C., & Leal, W.S. (2017).** Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of *Melipona scutellaris* stingless bee. *PLoS ONE*, 12(4), e0174857.
- **Centeno, S.A., & Shamir, J. (2008).** Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art. *Journal of Molecular Structure*, 873, 149-159. doi: 10.1016/j.molstruc.2007.03.026.
- **Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004).** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 116–126. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x
- **Chani-Posse, M. (2013).** Towards a natural classification of the subtribe Philonthina (Coleoptera: Staphylinidae: Staphylinini): A phylogenetic analysis of the Neotropical genera. *Systematic Entomology*, 38(2), 390-406.

- **Chapman, R.F. (1982).** Chemoreception: the significance of receptor numbers. *Advances in Insect Physiology*, 16, 247–356.
- **Chapman, R.F. (1998).** *The insects: structure and function*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- **Chapman, R.F. (2003).** Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 48, 455–484.
- **Chittka, L., & Thomson, J.D. (2001).** *Cognitive Ecology of Pollination - Animal Behavior and Floral Evolution*. Cambridge University Press. Edited by Lars Chittka and James D. Thomson. 423pp.
- **Coelho, J.R., & Holliday, C.W. (2008).** The effect of hind-tibial spurs on digging rate in female eastern cicada killers. *Ecological Entomology*, 33, 403–407
- **Colthub, N.B., Daly, L.H., & Wiberley, S.E. (1990).** *Introduction to infrared and Raman spectroscopy (2nd ed.)*. Academic Press, New York.
- **Cribb, B.W., Stewart, A., Huang, H., Truss, R., Noller, B., Rasch, R., & Zalucki, M.P. (2008a).** Insect mandibles-comparative mechanical properties and links with metal incorporation. *Naturwissenschaften*, 95, 17-23.
- **Cribb, B.W., Stewart, A., Huang, H., Truss, R., Noller B., Rasch, R., & Zalucki, M.P. (2008b).** Unique zinc mass in mandibles separates drywood termites from other groups of termites. *Naturwissenschaften*, 95, 433-441.
- **Csóka, G., Stone, G.N., & Melika, G. (2005).** *The biology, ecology and evolution of gall wasps*. In: Raman A, Schaeffer CW, Withers TM, editors. *Biology, ecology and evolution of gall-inducing arthropods*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers Inc. pp. 573-642.
- **Czamara, K., Majzner, K., Pilarczyk, M., Kochan, K., Kaczor, A., & Baranska, M. (2015).** Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46, 4–20. DOI: 10.1002/jrs.4607.
- **Da Rocha, L., Moreira, G., & Redaelli, L. (2007).** Morphology and distribution of antennal sensilla of *Gryon gallardoii* (Brethes) (Hymenoptera: Scelionidae) females. *Neotropical Entomology*, 36, 721–728.
- **Daily, G. C. (1997).** The potential impacts of global warming on managed and natural ecosystem: Implications for human well-being. *Abstracts of papers of the American Chemical Society*, 213, 12-envr.
- **Dalla Torre, von K.W. (1880).** Unsere Hummel- (**Bombus**) Arten. *Der Naturhistoriker*, 2, 40–1.
- **Danforth, B.N., Conway, L., & S. Ji. (2003).** Phylogeny of eusocial *Lasioglossum* reveals multiple losses of eusociality within a primitively eusocial clade of bees (Hymenoptera: Halictidae). **Systematic Biology**, 52(1), 23-36.

- **Darwin, C. (1871).** *The descent of man, and selection in relation to sex.* John Murray, London.
- **Das, P., Chen, L., Sharma, K.R., & Fadamiro, H.I. (2011).** Abundance of antennal chemosensilla in two parasitoid wasps with different degree of host specificity may explain sexual and species differences in their response to host-related volatiles. *Microscopy Research and Technique*, 74, 900–909.
- **De Gelder, J., De Gussem, K., Vandenabeele, P., & Moens, P. (2007).** Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38, 1133–1147. DOI: 10.1002/jrs.1734
- **Díaz, S., Demissew, S., Carabias, J., Joly, C., Lonsdale, M., Ash, N., Larigauderie, A., Adhikari, J.R., Arico, S., Báldi, A., Bartuska, A., Baste, I.A., Bilgin, A., Brondizio, E., Chan, K.M., Figueroa, V.E., Duraiappah, A., Fischer, M., Hill, R., Koetz, T., Leadley, P., Lyver, P., Mace, G.M., Martin-Lopez, B., Okumura, M., Pacheco, D., Pascual, U., Pérez, E.S.,Reyers, B., Roth, E., Saito, O., Scholes, R.H., Sharma, N., Tallis, H., Thaman, R., Watson, R., Yahara, T., Hamid, Z.A., Akosim, C.,Al-Hafedh, Y., Allahverdiyev, R., Amankwah, E., Asah, S.T., Asfaw, Z., Bartus, G., Brooks, L.A., Caillaux, J., Dalle, G., Darnaedi, D., Driver, A., Erpul, G., Escobar-Eyzaguirre, P., Failler, P., Fouda, A.M.M., Fu, B., Gundimeda, H., Hashimoto, S., Homer, F., Lavorel, S., Lichtenstein, G., Mala, W.A., Mandivenyi, W., Matczak, P., Mbizvo, C., Mehrdadi, M., Metzger, J.P., Mikissa, J.B., Moller, H., Mooney, H.A., Mumby, P., Nagendra, H., Nesshover, C., Oteng-Yeboah, A.A., Pataki, G., Roué, M., Rubis, J., Schultz, M., Smith, P., Sumaila, R., Takeuchi, K., Thomas, S., Verma, M., Yeo-Chang, Y., & Zlatanova, D. (2015).** The IPBES Conceptual Framework—connecting nature and people. *Current Opinion Environmental Sustainability*, 14, 1–16.
- **Dicke, M., & Grostal, P. (2001).** Chemical detection of natural enemies by arthropods: an ecological perspective. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 32, 1–23.
- **Dietz, A., & Humphreys, W.J. (1971).** Scanning electron microscopic studies of antennal receptors of the worker honey bee, including sensilla campaniformia. *Annals of the Entomological Society of America*, 64, 919–925.
- **Donaldson, J.S. (1992).** Adaptation for oviposition into concealed cycad ovules in the cycad weevils *Antliarhinus zamiae* and *A. signatus* (Coleoptera: Curculionoidea). *The Biological Journal of the Linnean Society*, 47, 23-35.
- **Donoghue, M.J., & Sanderson, M.J. (1989).** Patterns of variation in levels of homoplasy. *Evolution: international journal of organic evolution*, 43(8), 1781-1795.
- **Donovan, J.J., & Tingle, T.N. (1996).** An improved mean atomic number background correction for quantitative microanalysis. *Microscopy and Microanalysis*, 2, 1–7.

- **Dötterl, S., Füssel, U., Jürgens, A., & Aas, G. (2005).** 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal of Chemical Ecology*, 31:2993–8.
- **Dötterl, S., & Schäffler, I. (2007).** Flower scent of oil-producing *Lysimachia punctata* as attractant for the oil-bee *Macropis fulvipes*. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 441-445.
- **Dotterl, S., & Vereecken, N. (2010).** The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology*, 88, 668–697.
- **Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M.A., Kryukov, V.Y., Yaroslavtseva, O.N., Grizanova, E.V., Greig, C., Mukherjee, K., Vilcinskas, A., Mitkovets, P.V., Glupov, V.V., & Butt, T.M. (2013).** More than a colour change: insect melanism, disease resistance and fecundity. *Proceedings of the Royal Society B*, 280, 20130584. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.0584>
- **Duncumb, P. (1994).** Correction procedures in electron probe microanalysis of bulk samples. *Mikrochim Acta*, 114/11, 3-20.
- **Düster, J.V., Gruber, M.H., Karolyi, F., Plant, J.D., & Krenn H.W. (2018).** Drinking with a very long proboscis: Functional morphology of orchid bee mouthparts (Euglossini, Apidae, Hymenoptera). *Arthropod Structure & Development*, 47, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2017.12.004>
- **Dweck, H.K.M., & Gadallah, N.S. (2008).** Description of the antennal sensilla of *Habrobracon hebetor*. *BioControl*, 53, 841–856.
- **Edgecombe, G., & Hollintong, L. (2005).** Morphology and relationships of a new species of Henicops (Chilopoda: Lithobiomorpha) from New South Wales and Queensland, Australia. *Zootaxa*, 961, 1-20.
- **Edwards, A.J, Fawke, J.D., McClements, J.G., Smith, S.A., & Wyeth, P. (1993).** Correlation of zinc distribution and enhanced hardness in the mandibular cuticle of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Cell Biology International*, 17, 697–698.
- **Eisenman, H.C., & Casadevall, A. (2012).** Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbial Biotechnology*, 93, 931-940. doi: 10.1007/s00253-011-3777-2
- **Eli, M.S., Nicholas, R.F., Georg, F., Beatrice, L-B., & Evan, P.E. (2017).** Rise of the spiny ants: diversification, ecology and function of extreme traits in the hyperdiverse genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae), *Biological Journal of the Linnean Society*, 122, (3), 514–538, <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blx081>
- **Eliason, C.M., Bitton, P.-P., & Shawkey, M.D. (2013).** How hollow melanosomes affect iridescent colour production in birds. *Proceedings of the Royal Society B*, 280, 20131505. DOI: 10.1098/rspb.2013.1505

- **Engels, W.L. (1940).** Structural adaptations in thrashers (Mimidae: genus *Taxostoma*) with comments on interspecific relationships. *University California Publications Zoology*, 42, 341-400.
- **Erlich, P.R., & Wilson, E.O. (1991).** Biodiversity Studies: Science and Policy. *Science*, 253, 758-62
- **Esslen, J., & Kaissling, K.E. (1976).** Zahl und Verteilung antennaler Sensillen bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie*, 83, 227–251
- **Evans, D.L., & Waldbauer, G.P. (1982).** Behavior of adult and naive birds when presented with a bumblebee and its mimic. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 59, 247-259.
- **Fasel, A., Muller, P-A., Suppan, P., & Vauthey, E. (1997).** Photoluminescence of the African scorpion "Pandinus imperator". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 39, 96-98.
- **Fawke, J.D., McClements, J.G., & Wyeth, P. (1997).** Cuticular metals: quantification and mapping by complementary techniques. *Cell Biology International*, 21, 675-678.
- **Fedorka, K.M., Lee, V., & Winterhalter, W.E. (2013).** Thermal environment shapes cuticle melanism and melanin-based immunity in the ground cricket (*Allonemobius socius*). *Evolutionary Ecology*, 27, 521–531. doi: 10.1007/s10682-012-9620-0.
- **Ferrer-Suay, M., Jankovic, M., Selfa, J., Van Veen, F.F.J., Tomanovic, Z., Kos, K., Rakhshani, E., & Pujade-Villar J. (2014).** Qualitative analysis of aphid and primary parasitoid trophic relations of genus *Alloxysta* (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae: Charipinae). *Environmental Entomology*, 43, 1485–1495.
- **Fialho, M.D.C.Q., Guss-Matiello, C.P., Zanuncio, J.C., Campos, L.A.O., & Serrão, J.E. (2014).** A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. *Journal of Apicultural Research*, 53(3), 392–403.
- **Fontaine, A.R., Olsen, N., Ring, R.A., & Singla, C.L. (1991).** Cuticular metal hardening of mouthparts and claws of some forest insects of British Columbia. *The Journal of the Entomological Society of British Columbia*, 88, 45-55.
- **Fox, D.L. (1992).** *Animal Biochromes and Animal Structural Colours*, 2nd edition. University of California Press, Berkeley.
- **Friese, H., & Wagner, H. (1910).** Zoologische Studien an Hummeln. I. Die Hummeln der deutschen Fauna. *Zoologische Jahrbucher; Systematic Okologie und Geographic de Tiere*, 29, 1-104.
- **Frost, L.M., Butler, D.R., O'Dell, B., & Fet, V. (2001).** A coumarin as a fluorescent compound in scorpion cuticle. In *Scorpions 2001*. In Memoriam Gary A. Polis (eds V. Fet & P. A. Selden), pp. 365–368. Burnham Beeches, UK: British Arachnological Society

- Futahashi, R., Sato, J., Meng, Y., Okamoto, S., Daimon, T., Yamamoto, K., Suetsugu, Y., Narukawa, J., Takahashi, H., Banno, Y., Katsuma, S., Shimada, T., Mita, K., & Fujiwara, H. (2008). Yellow and ebony are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics*, 180, 1995–2005. doi: 10.1534/genetics.108.096388.
- Galván, I., & Jorge, A. (2015). Dispersive Raman spectroscopy allows the identification and quantification of melanin types. *Ecology and Evolution*, 5, 1425–1431. doi:10.1002/ece3.1453.
- Galván, I., Jorge, A., Edelaar, P., & Wakamatsu, K. (2015). Insects synthesize pheomelanin. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28, 599–602. DOI: 10.1111/pcmr.12397.
- Galván, I., Jorge, A., Ito, K., Tabuchi, K., Solano, F., & Wakamatsu, K. (2013). Raman spectroscopy as a non-invasive technique for the quantification of melanins in feathers and hairs. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26, 917–923. DOI: 10.1111/pcmr.12140.
- Galván, I., & Møller, A.P. (2013). Pheomelanin-based plumage coloration predicts survival rates in birds. *Physiological and Biochemical Zoology*, 86, 184–192. doi: 10.1086/668871
- Galván, I., Wakamatsu, K., Camarero, P.R., Mateo, R., & Alonso-Alvarez, C. (2015b). Low-quality birds do not display high-quality signals: The cysteine-pheomelanin mechanism of honesty. *Evolution*, 69, 26–38. doi: 10.1111/evo.12549.
- Galvani, G.L., González, A., Roig-Alsina, A.H., & Settembrini, B.P. (2012). Distribution and morphometric studies of flagellar sensilla in Emphorini bees (Hymenoptera, Apoidea). *Micron*, 43(5), 673–687.
- Galvani, G.L., González-Vaquero, R.A., Guerra-Navarro, C., & Settembrini, B.P. (2017). Antennal sensilla of cleptoparasitic and non-parasitic bees in two subfamilies of Apidae. *Apidologie*, 48(4), 437–449.
- Galvani, G.L., Settembrini, B.P., & Roig-Alsina, A.H. (2008). Morphology of antennal sensilla in *Doeringiella nobilis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 81, 142–152.
- Gao, Q., & Garcia-Pichel, F. (2011). **Microbial ultraviolet sunscreens.** *Nature Reviews Microbiology*, 9, 791–802. doi: 10.1038/nrmicro2649
- Gao, Y., Luo, L.Z., & Hammond, A. (2007). Antennal morphology, structure and sensilla distribution in *Microplitis pallidipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Micron*, 38, 684–693.
- García-Borrón, J.C., & Olivares Sánchez, M.C. (2011). *Biosynthesis of Melanins. Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological, and Pathological Functions.* (eds. J. Borovanský & P.A. Riley). pp. 87–116. Wiley-Blackwell, Weinheim. DOI: 10.1002/9783527636150.ch4

- **García-Guinea, J., Crespo-Feo, E., Correcher, V., Rubio, J., Roux, M.V., & Townsend, P.D., (2009b).** Thermo-optical detection of defects and decarbonation in natural Smithsonite. *Physics and Chemistry of Minerals*, 36, 431–438.
- **García-Guinea, J., Jorge, A., Tormo, L., Furio, M., Crespo-Feo, E., Correcher, V., Prado-Herrero, P., Soria, A.C., Sanz, J., & Nieves-Aldrey, J.L. (2011).** Ossification vesicles with calcium phosphate in the eyes of the insect *Copium teucrui* (Hemiptera: Tingidae). *Scientific World Journal*, 11, 186-198.
- **García-Guinea, J., Sanchez-Moral, S., Tormo, L., & Crespo-Feo, E., (2009a).** *The Villalbeto de la Pena Meteorite: Raman Spectroscopy and Cathodoluminescence of Feldspar*. In: Gucsik, A. (Ed). *Micro-Raman Spectroscopy and Luminescence Studies in the Earth and Planetary Sciences*. College Park, Maryland, American Institute of Physics. pp 141-147.
- **Gaston, K.J. (1991).** The Magnitude of Global Insect Species Richness. *Conservation Biology*, 5(3), 283-296.
- **Gaston, K. J. (1992).** Taxonomy of taxonomists. *Nature*, 356, 281–282.
- **Gauld, I.D. (1991).** The Ichneumonidae of Costa Rica, 1. *Memoirs of the American Entomological Institute*, 47, 1-589.
- **Gauld, I., & Bolton, B. (1988).** *The Hymenoptera*. Oxford: Oxford University Press
- **Gauld, I. D., & Hanson, P. E. (1995).** *The evolution, classification and identification of the Hymenoptera*. In P.E. Hanson & I. D. Gauld (Eds). *The Hymenoptera of Costa Rica* (pp. 138–156). New York: Oxford University Press.
- **Ghara, M., Kundanati, L., & Borges, R.M. (2011).** Nature's Swiss Army Knives: Ovipositor Structure Mirrors Ecology in a Multitrophic Fig Wasp Community. *PLoS ONE*, 6(8), e23642. doi:10.1371/journal.pone.0023642
- **Gibbs, P.E., & Bryan, G.W. (1980).** Copper—the major metal component of glycerid polychaete jaws. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 60, 205–214.
- **Gibson, G.A.P. (1985).** Some pro- and mesothoracic characters important for phylogenetic analysis of Hymenoptera, with a review of terms used for structures. *Canadian Entomologist*, 117, 1395–443.
- **Gibson, G.A.P. (1986).** Evidence for monophyly and relationships of Chalcidoidea, Mymaridae, and Mymarommatidae (Hymenoptera: Terebrantes). *The Canadian Entomologist*, 118, 205–240.
- **Gibson, G.A.P., Read, J., & Huber, J.T. (2007).** *Diversity, classification and higher relationships of Mymarommatoidea (Hymenoptera)*. *Journal of Hymenoptera Research*, 16, 51–146.
- **Godfray, H.C.J. (1994).** *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press.

- **Goncalves, R.C.R., Lisboa, H.C.F., & Pombeiro-Sponchiado, S.R. (2012).** Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, 1467–1474. doi: 10.1007/s11274-011-0948-3.
- **González-Vaquero, R.A., & Galvani, G.L. (2016).** Antennal sensilla analyses as useful tools in the revision of the sweat-bee subgenus *Corynura* (*Callistochlora*) Michener (Hymenoptera: Halictidae). *Zoologischer Anzeiger*, 262, 29-42.
- **González-Vaquero, R., Polidori C., & Nieves-Aldrey J. L. (2017).** Taxonomy and ecology of a new species of *Corynura* (Hymenoptera: Halictidae: Augochlorini) from Chile and Argentina. *Zootaxa*, 4221, 95–110.
- **Gordon, A.D. (1999).** *Classification, 2nd edition*. London: Chapman & Hall. 272 p.p
- **Gotte, T., & Richter, D.K. (2004).** **Quantitative high-resolution cathodoluminescence spectroscopy of smithsonite.** *Mineralogical Magazine*, 68, 199-207.
- **Götze, J., & Kempe, U. (2009).** *Physical Principles of Cathodoluminescence (CL) and its Applications in Geosciences*. In: Gucsik, A. (Ed). *Cathodoluminescence and its Application in the Planetary Sciences*. Berlin: Springer-Verla. pp 1-22.
- **Goulet, H., & Huber, J. T. (1993).** *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Ottawa, Ontario: Centre for Land and Biological Resources Research.
- **Graham, M.W.R. de V. (1969).** The Pteromalidae of Northwestern Europe. *Bulletin of the British Museum Natural History Entomology. Supplement*, 16, 1-908.
- **Grimaldi, D.A., & Engel, M.S. 2005.** *Evolution of the Insects*. (Cambridge University Press).
- **Groh, C., Brockman, A., Altwein, M., & Tautz, J. (2002).** Selective blocking of contact chemosensilla in *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33, 33–40.
- **Grzywacz, A., Szpila, K., & Pape, T. (2012).** Egg morphology of nine species of *Pollenia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). *Microscopy Research and Technique*, 75, 955–967. doi: 10.1002/jemt.22020
- **Guindre-Parker, S., & Love, O.P. (2014).** Revisiting the condition-dependence of melanin-based plumage. *Journal of Avian Biology*, 45, 29–33. DOI: 10.1111/j.1600-048X.2013.00190.x.
- **Gullan, P.J., & Cranston, P.S. (2010).** *The Insects: An Outline of Entomolog. 4th Ed.* Wiley-Blackwell
- **Gupta, M. (1992).** Scanning electron microscopic studies of antennal sensilla of adult workers of *Apis florea* F. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 23, 47–56.
- **Hanson, P.E., & Lasalle, J. (1995).** *The Chalcidoid families. Introduction*. In: Hanson, P.E., and Gauld, I. (Eds). *The Hymenoptera of Costa Rica*. The Natural History Museum, London. pp 266-272.

- **Hansson, B.S., & Stensmyr, M.C. (2011).** Evolution of insect olfaction. *Neuron*, 72(5), 698–711. pmid:22153368
- **Harrington, R., Anton, C., Dawson, T.P., De Bello, F., Feld, C.K., Haslett J.R., Kluvánková, T., Kontogianni, A., Lavorel, S., Luck G.W., Rounsevell, M.D.A., Samways, M.J., Settele, J., Skourtos, M., Spangenberg, J.H., Vandewalle, M., Zobel, M., & Harrison, P.A. (2010).** Ecosystem services and biodiversity conservation: Concepts and a glossary. *Biodiversity and Conservation*, 19(10), 2773-2790.
- **Hartenstein, V. (2005).** *Development of insect sensilla*. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, editors. *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 1. New York: Elsevier. pp 379–419.
- **Harvey, P.H., & Pagel, M.D. (1991).** *The comparative method in evolutionary Biology*. Oxford University Press, Oxford, England.
- **Hashimoto, Y. (1990).** Unique features of sensilla on the antennae of Formicidae (Hymenoptera). *Applied Entomology and Zoology*, 25, 491–501.
- **Haupt, S.S. (2007).** Central gustatory projections and side-specificity of operant antennal muscle conditioning in the honey bee. *The Journal of Comparative Physiology A*, 193, 523-535.
- **Hawkins, B.A. (1988).** Do galls protect endophytic herbivores from parasitoids? A comparison of galling and non-galling Diptera. *Ecological Entomology*, 13, 473-477.
- **Heath, J.J., Cipollini, D., & Stireman III, J.O. (2013).** The role of carotenoids and their derivatives in mediating interactions between insects and their environment. *Arthropod-Plant Interactions*, 7, 1-20. DOI: 10.1007/s11829-012-9239-7
- **Heinrich, B. (2004).** *Bumblebee economics*. Harvard University Press, Cambridge.
- **Heraty, J.M., Burks, R.A., Cruaud, A., Gibson, G.A.P., Liljeblad, J., Munro, J., Rasplus, J.Y., Delvare, G., Jansta, P., Gumovsky, A., Huber, J., Woolley, J.B., Krogmann, L., Heydon, S., Polaszek, A., Schmidt, S., Darling, D.C., Gates, M.W., Mottern, J., Murray, E., DalMolin, A., Triapitsyn, S., Baur, H., Pinto, J.D., van Noort S., George, J., & Yoder M. (2013).** A phylogenetic analysis of the megadiverse Chalcidoidea (Hymenoptera). *Cladistics*, 29 (5), 466-542. doi: 10.1111/cla.12006
- **Heraty, J.M., & Quicke, D.L.J. (2003).** Phylogenetic implications of ovipositor structure in Eucharitidae and Perilampidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Natural History*, 37, 1751-1764.
- **Heraty, J., Ronquist, F., Carpenter, J.M., Hawks, D., Schulmeister, S., Dowling, A.P., Murray, D., Munro, J., Wheeler, W.C., Schiff, N. & Sharkey, M. (2011).** Evolution of the hymenopteran megaradiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60, 73-88.

- **Herman, L.H. (1972).** Revision of *Bledius* and related genera. Part I. The aequatorialis, mandibularis, and semiferrugineus groups and two new genera (Coleoptera, Staphylinidae, Oxytelinae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 149, 111–254.
- **Hillerton, J.E., Reynolds, S.E., & Vincent, J.F.V. (1982).** On the indentation hardness of insect cuticle. *Journal of Experimental Biology*, 96, 45-52.
- **Hillerton, J.E., Robertson, B., & Vincent, J.F.V. (1984).** The presence of Zinc or Manganese as the predominant metal in the mandibles of adult stored-product beetles. *Journal of Stored Products Research*, 20, 133-137.
- **Hillerton, J.E., & Vincent, J.F.V. (1982).** The specific location of zinc in insect mandibles. *Journal of Experimental Biology*, 101: 333-336.
- **Hines, H.M. (2008a).** *Bumble bees (Apidae: Bombus) through the ages: Historical biogeography and the evolution of color diversity*. Chapter 3 – Characterization of the pigments responsible for pile coloration in bumble bees. University of Illinois, Urbana-Champaign, PhD thesis.
- **Hines, H.M. (2008b).** Historical biogeography, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Systematic Biology*, 57, 58–75. doi: 10.1080/10635150801898912
- **Hines, H.M., & Williams, P.H. (2012).** Mimetic colour pattern evolution in the highly polymorphic *Bombus trifasciatus* (Hymenoptera: Apidae) species complex and its comimics. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166, 805-826. DOI: 10.1111/j.1096-3642.2012.00861.x
- **Holden, A.R., Koch, J.B., Griswold, T., Erwin, D.M., & Hall, J. (2014).** Leafcutter Bee Nests and Pupae from the Rancho La Brea Tar Pits of Southern California: Implications for Understanding the Paleoenvironment of the Late Pleistocene. *PLoS ONE*, 9(4): e94724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094724>
- **Hörschemeyer, T., Beutel, R.G., & Pasop, F. (2002).** Head structures of *Priacma serrata* leconte (coleptera, archostemata) inferred from X-ray tomography. *Journal of Morphology*, 252(3), 298-314.
- **Howell, A.D., & Alarcón, R. (2007).** *Osmia* bees (Hymenoptera: Megachilidae) can detect nectar-rewarding flowers using olfactory cues. *Animal Behaviour*, 74, 199–205.
- **Hsiung, B.-K., Blackledge, T.A., & Shawkey, M.D. (2015).** *Spiders do have melanin after all*. *Journal of Experimental Biology*, 218, 3632-3635.
- **Huang, Z., Lui, H., Chen, X.K., Alajlan, A., McLean, D.I., & Zeng, H. (2004).** Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. *Journal of Biomedical Optics*, 9, 1198–1205. doi:10.1117/1.1805553
- **Hunt, J.H. (2007).** *The evolution of social wasps*. Oxford University Press.

- **Hymenoptera Anatomy Consortium. (2014).** Available at <http://glossary.hymao.org>.
- **Isidoro, N., Bin, F., Colazza S., & Vinson, S.B. (1996).** Morphology of antennal gustatory sensilla and glands in some parasitoids Hymenoptera with hypothesis on their role in sex and host recognition. *Journal of Hymenoptera Research*, 5, 206-239.
- **Isidoro, N., Bin, F., Romani, R., Pujade-Villar, J., & Ros-Farré, P. (1999).** Diversity and function of male antennal glands in Cynipoidea (Hymenoptera). *Zoologica Scripta*, 28, 165–174.
- **Isrealowitz, M., Rizvi, S.H.W., & von Schroeder, H.P. (2007).** Fluorescence of the “fire chaser” beetle, *Melanophila acuminata*. *Journal of Luminiscence*, 126,149-154.
- **Ito, S., & Wakamatsu, K. (2003).** Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Research*, 16, 523–531. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2003.00072.x.
- **Ito, S., Wakamatsu, K., D’Ischia, M., Napolitano, A., & Pezzella, A. (2011).** *Structure of melanins. Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological, and Pathological Functions.* (eds. J. Borovanský & P.A. Riley), pp. 167–185. Wiley-Blackwell, Weinheim. DOI: 10.1002/9783527636150.ch6
- **Jamialahmadi, K., Behravan, J., Fathi Najafi, M., Tabatabaei Yazdi, M., Shahverdi, A.R., & Faramarzi, M.A. (2011).** Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Chitin Using Crude Enzyme Preparation of *Aeromonas sp.* PTCC1691. *Biotechnology*, 10, 292-297. doi: 10.3923/biotech.2011.292.297.
- **Jawor, J.M., & Breitwisch, R. (2003).** Melanin ornaments, honesty, and sexual selection. *Auk*, 120, 249–265. DOI: 10.2307/4090178.
- **Johnson, L.K., & Howard, J.J. (1987).** Olfactory disc number in bee of different sizes and ways of life (Apidae: Meliponinae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 60(3), 380–388.
- **Johnson, B.R., Borowiec, M.L., Chiu, J.C., Lee, E.K., Atallah, J., & Ward, P.S. (2013).** Phylogenomics Resolves Evolutionary Relationships among Ants, Bees, and Wasps. *Current Biology*, 23(20), 2058-2062.
- **Johnson, N.F. (1988).** Midcoxal articulations and the phylogeny of the order Hymenoptera. *Annals of the Entomological Society of America*, 81, 870–81.
- **Jorge A., Polidori C., Garcia-Guinea J., & Nieves-Aldrey J. L. (2017).** Spectral cathodoluminescence analysis of hymenopteran mandibles with different levels of zinc enrichment in their teeth. *Arthropod Structure & Development*, 46, 39-48.

- **Jorge García, A., Polidori, C., & Nieves-Aldrey J.L. (2016).** Pheomelanin in the secondary sexual characters of male parasitoid wasps (Hymenoptera: Pteromalidae). *Arthropod Structure & Development*, 45, 311-319. doi:10.1016/j.asd.2016.05.001
- **Jourdan, H., Barbier, R., Bernard, J., & Ferran, A. (1995).** Antennal sensilla and sexual dimorphism of the adult ladybird beetle *Semiadalia undecimnotata* Schn. (Coleoptera: Coccinellidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 24, 307–322.
- **Karr, J.R. & James, F.C. (1975).** *Ecomorphological configurations and convergent evolution of species and communities*. In: Cody, M.L. & Diamond, J.M. (Eds.) *Ecology and Evolution of Communities*, pp. 258-291. Harvard University Press, Cambridge.
- **Katona, T.M., Craven, M.D., Speck, J.S., & DenBaars, S.P. (2004).** Cathodoluminescence study of deep ultraviolet quantum wells grown on maskless laterally epitaxial overgrown AlGaIn. *Applied Physics Letters*, 85, 1350-1352.
- **Keil, T.A. (1997).** Functional morphology of insect mechanoreceptors. **Microscopy Research and Technique**, 39(6), 506–531.
- **Keil, T.A. (1999).** *Morphology and development of the peripheral olfactory organs*. B.S. Hansson (Ed.), *Insect Olfaction*, Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp. 5-47.
- **Kelber, C., & Rössler, W. (2012).** The olfactory system of closely related wild bee species - neuroanatomical correlations to social organization and floral preference. Abstracts from the Thirty-fourth Annual Meeting of the Association for Chemoreception Sciences. *Chemical Senses* 38, 356.
- **Kevan, P.G., & Lane, M.A. (1985).** Flower petal microtexture is a tactile cue for bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 4750-4752.
- **Kevan, P.G., & Viana, B.F. (2003).** The global decline of pollination services. *Biodiversity*, 4, 3–8.
- **Kim, E., Panzella, L., Micillo, R., Bentley, W.E., Napolitano, A., & Payne, G.F. (2015).** Reverse engineering applied to red human hair pheomelanin reveals redox-buffering as a pro-oxidant mechanism. *Scientific Reports*, 5, 18447. DOI: 10.1038/srep18447.
- **Kindra, A., Scott, M. R., Susan, E. M. (2007).** Spiders fluoresce variably across many taxa. *Biology Letters*, 3 (3) 265-267.
- **Kleijn, D., Winfree, R., Bartomeus, I., Carvalheiro, L.G., Henry, M., Isaacs, R., Klein, A.-M., Kremen, C., M'Gonigle, L.K., Rader, R., Ricketts, T.H., Williams, N.M., Adamson, N.L., Ascher, J.S., Báldi, A., Batáry, P., Benjamin, F., Biesmeijer, J.C., Blitzer, E.J., Bommarco, R., Brand, M.R., Bretagnolle, V., Button, L., Cariveau, D.P., Chifflet, R., Colville, J.F., Danforth, B.N., Elle, E., Garratt, M.P.D., Herzog, F., Holzschuh, A., Howlett, B.G., Jauker, F., Jha, S., Knop, E., Krewenka,**

- K.M., Le Féon, V., Mandelik, Y., May, E.A., Park, M.G. Pisanty, G., Reemer, M., Riedinger, V., Rollin, O., Rundlöf, M. Sardiñas, H.S., Scheper, J., Sciligo, A.R., Smith, H.G., Steffan-Dewenter, I., Thorp, R., Tschardtke, T., Verhulst, J., Viana, B.F., Vaissière, B.E., Veldtman, R., Ward, K.L., Westphal, C., & Potts, S.G. (2015). Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. *Nature communications*, 6(1).
- Klein, A-M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., & Tschardtke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings*, 274(1608), 303-313.
 - Kleineidam, C., Romani, R., Tautz, J., & Isidoro, N. (2000). Ultrastructure and physiology of the CO₂ sensitive sensillum ampullaceum in the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Arthropod Structure & Development*, 29, 43–55.
 - Klemming, J.M. (2002). *Evolución: la base de la biología*. Coordinador Manuel Soler Cruz, 2002, ISBN 84-8254-139-0, pp. 27-44
 - Klopstein, S., Quicke, D.L.J., & Kropf, C. (2010). The evolution of antennal courtship in diplazontine parasitoid wasps (Hymenoptera, Ichneumonidae, Diplazontinae). *BMC Evolutionary Biology*, 10, 218.
 - Klopstein, S., Vihelmsen, L., Heraty, J., Sharkey, M., & Ronquist, F. (2013). The hymenopteran tree of life: evidence from protein-coding genes and objectively aligned ribosomal data. *PLoS ONE*, 8, e69344.
 - Koch, P.B., Behnecke, B., & French-Constant, R.H. (2000). The molecular basis of melanism and mimicry in a swallowtail butterfly. *Current Biology*, 10, 591–594.
 - Koch, P.B., Keys, D.N., Rocheleau, T., Aronstein, K., Blackburn, M., Carroll, S.B., & French-Constant, R.H. (1998). Regulation of dopa decarboxylase expression during colour pattern formation in wild-type and melanic tiger swallowtail butterflies. *Development*, 125, 2303–2313.
 - Kohler, L.J., Carton, Y., Mastore, M., & Nappi, A.J. (2007). Parasite suppression of the oxidations of eumelanin precursors in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 66, 64–75. DOI: 10.1002/arch.20199.
 - Kostova, I., Tormo, L., Crespo-Feo, E., & García-Guinea, J. (2012). Study of coal and graphite specimens by means of Raman and cathodoluminescence. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 91, 67-74.
 - Kumazawa, K., & Tabata, H. (2001). A three-dimensional fluorescence analysis of the wings of male *Morpho sulkowskyi* and *Papilio xuthus* butterflies. *Zoological Science*, 18, 1073-1079.

- **Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2010).** Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8, 1567–1636.
- **Kundanati, L., & Gundiah, N. (2014).** Biomechanics of substrate boring by fig wasps. *Journal of Experimental Biology*, 217, 1946-1954.
- **Lacher, V. (1964).** Elektrophysiologische Untersuchungen an einzelnen Rezeptoren für Geruch, Kohlendioxid, Luftfeuchtigkeit und Temperatur auf den Antennen der Arbeitsbiene und der Drohne (*Apis mellifera* L.). *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 48, 587–623.
- **Larkin, L.L., Neff, J.L., & Simpson, B.B. (2008).** The evolution of a pollen diet: host choice and diet breadth of *Andrena* bees (Hymenoptera: Andrenidae). *Apidologie*, 39, 133–145.
- **LaSalle, J., & Gauld, I.D. (1991).** Parasitic Hymenoptera and the biodiversity crisis. *Redia*, 74, 315-334.
- **LaSalle, J., & Gauld, I.D. (1993).** Hymenoptera: their biodiversity, and their impact on the diversity of other organisms. *Hymenoptera and Biodiversity*, pp1-26 ref.82.
- **Lauder, G.V. (1990).** Functional morphology and systematics: Studying functional patterns in an Historical context. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21, 317-340.
- **Lauder, G.V. (1991).** *Biomechanics and evolution: integrating physical and historical biology in the study of complex systems*. In Rayner, J.M.K. & Wooton, R.J. (Eds.) *Biomechanics in evolution*. SEB Seminar Series 36. Cambridge University Press.
- **Leisler, E. (1980).** Morphological aspects of ecological specialization in bird genera. *Oekologie der Vögel*, 2, 199-220.
- **Lelej, A.S., & Schmid-Egger, C. (2005).** The velvet ants (Hymenoptera, Mutillidae) of Central Europe. *Linzer Biologische Beiträge*, 37, 1005-1043.
- **Lemons, T.R. Liu, J., & Popadić, A. (2016).** The contribution of the melanin pathway to overall body pigmentation during ontogenesis of *Periplaneta americana*. *Insect Science*, 23, 513-519. DOI: 10.1111/1744-7917.12356
- **Letzkus, P., Ribí, W.A., Wood, J.T., Zhu, H., Zhang, S.-W., & Srinivasan, M.V. (2006).** Lateralization of olfaction in the Honeybee *Apis mellifera*. *Current Biology*, 16, 1471-1476.
- **Li, Z., Yang, P., Peng, Y., & Yang, D. (2009).** Ultrastructure of antennal sensilla of female *Ceratosolen solmsi marchali* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Agaonidae: Agaoninae). *The Canadian Entomologist*, 141, 463–477.

- **Lichtenegger, H.C., Schöberl, T., Bartl, M.H., Waite, H., & Stucky, G.D. (2002).** High abrasion resistance with sparse mineralization: copper biomineral in worm jaws. *Science*, 298, 389–392.
- **Lichtenegger, H.C., Schöberl, T., Ruokalainen, J.T., Cross, J.O., Heald, S.M., Birkedal, H., Waite, J.H., & Stucky, G.D. (2003).** Zinc and mechanical prowess in the jaws of Nereis, a marine worm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences (USA)*, 100: 9144-9149.
- **Liljeblad, J., Ronquist, F., Nieves-Aldrey, J.L., Fontal-Cazalla, F., Ros-Farre, P., Gaitrosd, D., & Pujalde-Villar, J. (2008).** A fully web-illustrated morphological phylogenetic study of relationships among oak gall wasps and their closest relatives (Hymenoptera: Cynipidae). *Zootaxa*, 1796, 1-73.
- **Lindstedt, C., Morehouse, N., Pakkanen, H., Casas, J., Christides, J.P., Kemppainen, K., Lindström, L., & Mappes, J. (2010).** Characterizing the pigment composition of a variable warning signal of *Parasemia plantaginis* larvae. *Functional Ecology*, 24, 759-766. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2010.01686.x.
- **Lister, A. (2011).** Natural history collections as sources of long-term datasets. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(4), 153-154.
- **Lloyd, J.E. (1983).** Bioluminescence and communication in insects. *Annual Review of Entomology*, 28, 131-60.
- **Lopez Ruiz, J. (1996).** *Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis por Rayos X*. Editorial Rueda, S.L en colaboración con el CSIC.
- **Losos, J.B. (1990a.)** Ecomorphology, performance capability, and scaling of West Indian Anolis lizards: An evolutionary analysis. *Ecological Monographs*, 60, 369-388.
- **Losos, J.B. (1990b).** The evolution of form and function: morphology and locomotor performance ability in West Indian *Anolis* lizards. *Evolution*, 44, 1189-1203.
- **MacNally, R.X., & Doolan, J.N. (1986).** Patterns of morphology and behaviour in a cicada guild: a neutral model analysis. *Australian Journal of Ecology*, 11, 279-294.
- **Majerus, M.E. (1998).** *Melanism: Evolution in Action*. Oxford University Press, Oxford.
- **Malm, T., & Nyman, T. (2015).** Phylogeny of the symphytan grade of Hymenoptera: new pieces into the old jigsaw (fly) puzzle. *Cladistics*, 31, 1-17
- **Marshall, D.J. (1988).** *Cathodoluminescence of Geological Materials*. Unwin-Hyman, Boston.
- **Martin, H., & Lindauer, M. (1966).** Sinnesphysiologische Leistungen beim Wabenbauder Honig-biene. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 53, 372-404.

- **Martini, R. (1986).** Fine structure and development of the large sensilla basiconica of the antennae of sphecid wasps. *Tissue Cell*, 18, 143–151.
- **McClintock, J.B., Amsler, M.O., Angus, R.A., Challener, R.C., Schram, J.B., Amsler, C.D., Mah, C.L., Cuce, J., & Baker, B.J. (2011).** The Mg-Calcite composition of Antarctic echinoderms: important implications for predicting the impacts of ocean acidification. *Journal of Geology*, 119, 457-466.
- **McGraw, K.J. (2008).** An update of the honesty of melanin-based color signals in birds. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 21, 133–138. doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00454.x.
- **Medianero, E., & Nieves-Aldrey, J. L. (2017).** First record of the oak gall wasp genus *Neuroterus* Hartig, 1840 (Hymenoptera, Cynipidae, Cynipini) from Central America with description of three new species from Panama and Costa Rica. *Graellsia*, 73(1), e057. <http://dx.doi.org/10.3989/graellsia.2017.v73.178>
- **Meng, Z.J., Yan, S.C., Yang, C.P., & Ruan, C.C. (2012).** Asymmetrical Distribution of Antennal Sensilla in the Female *Anastatus japonicus* Ashmead (Hymenoptera: Eupelmidae). *Microscopy Research and Technique*, 75, 1066–1075.
- **Merivee, E., Vanatoa, A., Luik, A., Rahi, M., Sammelseg, V., & Ploomi, A. (2003)** Electrophysiological identification of cold receptors on the antennae of the ground beetle *Pterostichus aethiops*. *Physiological Entomology*, 28, 88–96.
- **Merlin, J.C. (1985).** Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems. *Pure and Applied Chemistry*, 57, 785–792.
- **Michener, C.D. (1974).** *The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study*. Cambridge, MA. Harvard Univ. Press. 404 pp
- **Michener, C.D. (2007).** *The Bees of the World*, 2nd Ed. John Hopkins University Press, Baltimore.
- **Michez, D., Patiny, S., Rasmont, P., Timmermann, K., & Vereecken, N.J. (2008).** Phylogeny and host-plant evolution in *Melittidae* s.l. (Hymenoptera: Apoidea). *Apidologie*, 39, 146–162.
- **Middendorf, H.D. (1974).** The shape of spectral lines: Analytical deconvolution and matching of Peyre-principi profiles. *Nuclear Instruments and Methods*, 114, 397-399.
- **Miller, K.B., & Perkins, P.D. (2012).** The Diving Beetle Species *Hydrotrupes palpalis* Sharp, 1882 (Coleoptera: Dytiscidae). *The Coleopterists Bulletin*, 66(4), 371-377.
- **Mitroiu, M-D. (2010).** Secondary sexual characters of pteromalid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea, Pteromalidae). *Analele Științifice ale Universității, "Al. I. Cuza" Iași, s. Biologie animală*, 56, 83–89.

- **Miyazaki, S., Okada, Y., Miyakawa, H., Tokuda, G., Cornette, R., Koshikawa, S., Maekawa, K., & Miura, T. (2014).** Sexually dimorphic body color is regulated by sex-specific expression of yellow gene in ponerine ant, *Diacamma* sp. *PLoS ONE*, 9: e92875. DOI: 10.1371/journal.pone.0092875.
- **Moreira da Silva, I., de Sousa Pereira, K., Spranghers, T., Zanoncio, J.C., & Serrão, J.E. (2016).** Antennal Sensilla and Sexual Dimorphism of the Parasitoid *Trichospilus pupivorus* (Hymenoptera: Eulophidae). *Microscopy and Microanalysis*, 22, 04, (913).
- **Moreno, E., & Carrascal, L.M. (1993).** Leg morphology and feeding postures in four *Parus* species: an experimental ecomorphological approach. *Ecology*, 74, 2037-2044.
- **Moreno, E., & Carrascal, L.M. (1994).** Ecomorphological patterns for aerial feeding oscines. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50 (2), 147-165.
- **Morgan, T.D., Baker, P., Kramer, K.J., Basibuyuk, H.H., & Quicke, D.L.J. (2003).** Metals in mandibles of stored products insects: do zinc and manganese enhance the ability of larvae to infest seeds? *Journal of Stored Product Research*, 39, 65–75.
- **Morris, G.A., Barjat, H., & Horne, T.J. (1997).** Reference Deconvolution Methods. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 31, 197-257.
- **Müller, A. 1996.** Host-plant specialization in western palearctic anthidiine bees (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae). *Ecological Monographs*, 66, 235–257.
- **Munjal, A.K., Karan, D., Gibert, P., Moreteau, B., Parkash, R., & David, J.R. (1997).** Thoracic trident pigmentation in *Drosophila melanogaster*. Latitudinal and altitudinal clines in Indian populations. *Genetics Selection Evolution*, 29, 601-610. doi: 10.1186/1297-9686-29-5-601.
- **Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F., & Nishikawa, M. (2009).** Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell and Tissue Research*, 338, 79–97
- **Napolitano, A., Panzella, L., Monfrecola, G., & d'Ischia, M. (2014).** Pheomelanin-induced oxidative stress: bright and dark chemistry bridging red hair phenotype and melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27, 721–733. doi: 10.1111/pcmr.12262
- **Nappi, A.J., & Christensen, B.M. (2005).** Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 443–459. doi:10.1016/j.ibmb.2005.01.014
- **Navasero, R.C., & Elzen, G.W. (1991).** Sensilla on the antennae, foretarsi and palpi of *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 93, 343–347.

- **Needham, A.E. (1978).** *Insect biochromes: Their chemistry and role.* In: Rockstein, M. (Ed.) *Biochemistry of insects.* Academic Press, New York. pp. 233-305.
- **Neff, J. (1993).** *Hymenoptera and biodiversity.* Oxon: C A B International. pp.143-167
- **Neville, A.C. (1975).** *Biology of the Arthropod Cuticle.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- **Nielsen, E.S., & Mound, L.A. (2000).** *Global diversity of insects: the problems of estimating numbers.* National Academy Press. See Ref. 47, pp. 213–21
- **Niemi, G.R. (1985).** Patterns of morphological evolution in bird genera of new world and old world peatlands. *Ecology*, 66, 1215—1228.
- **Nieves-Adrey, J.L. (1983).** Sobre las especies del género *Mesopolobus* (Hymenoptera: Pteromalidae) asociadas con agallas de cinípidos en *Quercus* spp. en Salamanca. *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 7, 9-18.
- **Nieves-Aldrey, J.L. (2001).** *Hymenoptera, Cynipidae.* In: Fauna Ibérica, vol. XVI Ramos, MA, et al., editors. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC). 636 pp.
- **Nieves-Aldrey, J.L., Liljeblad, J., Nieves, M.H., Grez, A., & Nylander, J.A.A. (2009).** Revision and phylogenetics of the genus *Paraulax kieffer* (Hymenoptera, Cynipidae) with biological notes and description of a new tribe, a new genus, and five new species. *Zootaxa*, 2200, 1-40.
- **Nieves-Aldrey, J.L., & Sharkey, M.J. (2014).** *Hymenopterans: Ants, Bees, Wasps and the Majority of Insect Parasitoids.* pp 395-408. (In) Vargas P, Zardoya R (eds). *The Tree of Life*, Sinauer, Sunderland, MA.
- Nijhout, H.F. (1997). **Ommochrome pigmentation on the linea and rosa seasonal forms of *Precis coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae).** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 36, 215-222.
- **Nishido, H., Makio, M., Kusano, N., & Ninagawa, K. (2013).** Blue cathodoluminescence related to defect center in smithsonite. *Journal of Mineralogical and Petrological Sciences*, 108, 351-355.
- **Norton, W.N., & Vinson, S.B. (1974).** Antennal sensilla of three parasitic hymenoptera. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 3, 305–316.
- **Nosanchuk, J.D., & Casadevall, A. (2006).** Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 3519–3528. DOI: 10.1128/AAC.00545-06
- **Noyes, J. (1982).** Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Journal of Natural History*, 16(3), 315-334.

- **Noyes, J.S. (2003).** *Universal Chalcidoidea Database.* World Wide Web electronic publication. www.nhm.ac.uk/entomology/chalcidoids/index.html
- **Nylander, J.A.A., Buffington, M.L., Liu, Z., Nieves-Aldrey, J.L., Liljeblad, J., & Ronquist, F. (2004a).** *Molecular phylogeny and evolution of gall wasps.* In: Nylander JAA, editor. Bayesian Phylogenetics and the Evolution of Gall Wasps. Uppsala: University of Uppsala. Ph.D. thesis, chapter IV.
- **Obonyo, M., Schulthess, F., Chimtawi, M., Mascarel, G., Ahuya, P.O., & LeRu, B. (2011).** Sensilla on antennae, ovipositor and tarsi of the larval braconid parasitoids, *Cotesia sesamiae* and *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae): a comparative scanning electron microscopy study. *Annales de la Société Entomologique de France*, 47, 119–127.
- **Ochieng, S.A., Park, K.C., Zhu, J.W., & Baker, T.C. (2000).** Functional morphology of antennal chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Arthropod Structure & Development*, 29, 231–240.
- **Ødegaard, F. (2000).** How many species of arthropods? Erwin's estimate revisited. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71, 583–97
- **Okamoto, S., Futahashi, R., Kojima, T., Mita, K. & Fujiwara, H. (2008).** A catalogue of epidermal genes: genes expressed in the epidermis during larval molt of the silkworm **Bombyx mori**. *BMC Genomics*, 9, 396. DOI: 10.1186/1471-2164-9-396.
- **Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011).** How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, 120(3), 321-326.
- **Olson, D.M., & Andow, D.A. (1993).** Antennal sensilla of female *Trichogramma nubilale* (Ertle and Davis) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and comparisons with other parasitic Hymenoptera. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 22, 507–520.
- **Onagbola, E.O., Boina, D.R., Hermann, S.L., & Stelinski, L.L. (2009).** Antennal sensilla of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102, 523–531.
- **Onagbola, E.O., & Fadamiro, H.Y. (2008).** Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Micron*, 39, 526–535.
- **O'Neill, K.M. (2001).** *Solitary Wasps: Natural History and Behavior.* Ithaca, NY: Cornell University Press
- **Ornosa, C., & Ortiz-Sánchez, F.J. (2004).** *Hymenoptera: Apoidea I.* Fauna Ibérica, vol. 23. CSIC, Madrid.

- **Ortiz-Sanchez, F. (2006).** A preliminary list of the Apoidea (Hymenoptera) of Andalusia (south of the Iberian Peninsula). [List preliminar de los Apoidea (Hymenoptera) de Andalucía (sur de la Península Ibérica)]. *Acta Granatense : Revista de la Sociedad Granatense de Historia Natural*, 4-5, 17-39.
- **Owen, R.E., & Plowright, R.C. (1980).** Abdominal pile color dimorphism in the bumble bee **Bombus melanopygus**. *Journal of Heredity*, 71, 241–247.
- **Owen, R.E., Whidden, T.L., & Plowright, R.C. (2010).** Genetic and morphometric evidence for the conspecific status of the bumble bees, **Bombus melanopygus** and **Bombus edwardsii**. *Journal of Insect Science*, 10, 109. doi: 10.1673/031.010.10901
- **Ozaki, M., & Tominaga, Y. (1999).** *Chemoreceptors*. In: Eguchi E, Tominaga Y, editors. Atlas of Arthropod Sensory Receptors. Tokyo: Springer-Verlag. pp 143–154.
- **Packwood, R. (1991).** *A comprehensive theory of electron probe microanalysis*. In: Heinrich K, Newbury D, editors. Electron Probe Quantitation. New-York: Plenum Press. pp. 83-103.
- **Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010).** The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(16), 1-14.
- **Padmavathy, N., & Vijayaraghavan, R. (2008).** Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*, 9, 1-7.
- **Pekkarinen, A. (1979).** Morphometric, colour and enzyme variation in bumblebees (Hymenoptera, Apidae, **Bombus**) in Fennoscandia and Denmark. *Acta Zoologica Fennica*, 158, 1-60.
- **Perna, G., Lasalvia, M., Gallo, C., Quartucci, G., & Capozzi, V. (2013).** Vibrational characterization of synthetic eumelanin by means of raman and surface enhanced raman scattering. *The Open Surface Science Journal*, 5, 1-8. DOI: 10.2174/1876531901305010001.
- **Peters R.S., Krogmann L., Mayer C., Donath A., Gunkel S., Meusemann K., Kozlov A., Podsiadlowski L., Petersen M., Lanfear R., Diez P.A., Heraty J., Kjer K.M., Klopstein S., Meier R., Polidori C., Schmitt T., Liu S., Zhou X., Wappler T., Rust J., Misof B., & Niehuis O. (2017).** Evolutionary history of the Hymenoptera. *Current Biology*, 27, 1013-1018.
- **Petrov, V.I. (1996).** Cathodoluminescence microscopy. *Physics–Uspekhi*, 39, 807–818.
- **Pianka, E.R. (1986).** *Ecology and natural history of desert lizards*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- **Pimm, S.L., Russell, G.J., Gittleman, J.L., & Brooks, T.M. (1995).** *The Future of Biodiversity*. *Science*, 269(5222), 347-350.
- **Plotkin, M., Volynchik, S., Ermakov, N., Benyamini, A., Boiko, Y., Bergman, D.J., & Ishay, J.S. (2009).** Xanthopterin in the oriental hornet (*Vespa orientalis*): Light absorbance is increased with

- maturation of yellow pigment granules. *Photochemistry and Photobiology*, 85, 955-961. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00526.x.
- **Plotkin, M., Hod, I., Zaban, A., Boden, S.A., Bagnall D.M., Galaushko, D., & Bergman D.J. (2010).** Solar energy harvesting in the epicuticle of the oriental hornet (*Vespa orientalis*) *Naturwissenschaften*, 97, 1067-1076. <https://doi.org/10.1007/s00114-010-0728-1>
 - **Plowright, R.C., & Owen, R.E. (1980).** The evolutionary significance of bumble bee color patterns: A mimetic interpretation. *Evolution*, 34, 622–637.
 - **Polidori, C., Bevacqua, S., & Andrietti, F. (2010).** Do digger wasps time their provisioning activity to avoid cuckoo wasps (Hymenoptera: Crabronidae and Chrysididae)? *Acta Ethologica*, 13, 11-21.
 - **Polidori, C., Freitas-Cerqueira, A., Pujade-Villar, J., Oliva, F., & Ferrer-Suay M. (2016).** Flagellar sensillar equipment of two morphologically closely related aphid-hyperparasitoids (Hymenoptera: Figitidae: *Alloxysta*). *Journal of Insect Science*, 16, 10, doi: 10.1093/jisesa/iev149.
 - **Polidori, C., Jorge, A., & Nieves-Aldrey, J.L. (2013).** Breaking up the wall: metal enrichment in ovipositors, but not in mandibles, co-varies with substrate hardness in Gall-Wasps and their associates. *PLoS ONE*, 8, 1-7.
 - **Polidori C., Jorge García, A., & Nieves-Aldrey, J.L. (2012).** Antennal sensillar equipment in closely related predatory wasp species (Hymenoptera: Philanthinae) hunting for different prey types. *Comptes Rendus Biologies*, 335, 279-291.
 - **Polidori, C., Mendiola, P., Asís, J.D., Tormos, J., & Selfa, J. (2010).** Temporal asynchrony and spatial co-occurrence with the host: the foraging patterns of *Nemka viduata*, a parasitoid of digger wasps (Hymenoptera: Mutillidae and Crabronidae). *Journal of Ethology*, 28, 353-361.
 - **Polidori C., & Nieves-Aldrey J.L. (2014).** Diverse filters to sense: great variability of antennal morphology and sensillar equipment in Gall-Wasps (Hymenoptera: Cynipidae). *PLoS ONE*, 9(7), e101843.
 - **Polidori, C., Nieves-Aldrey, J.L., Gilbert, F., & Rotheray, G. (2014).** Hidden in taxonomy: Batesian mimicry by a syrphid fly towards a Patagonian bumblebee. *Insect Conservation and Diversity*, 7, 32-40. DOI: 10.1111/icad.12028.
 - **Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W.E. (2010).** Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353.
 - **Pouchou, J.L., & Pichoir, F. (1991).** *Quantitative analysis of homogeneous or stratified microvolumes applying the model "PAP"*. In: Heinrich K, Newbury D, editors. *Electron Probe Quantitation*. New-York: Plenum Press. pp. 31-76.

- **Price, A.C., Weadick, C.J., Shim, J., & Rodd, F.H. (2008).** Pigments, patterns, and fish behavior. *Zebrafish*, 5, 297–307. doi: 10.1089/zeb.2008.0551
- **Pryor, M.G.M. (1940).** On the hardening of the cuticle of insects. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 128, 393–407.
- **Quicke, D.L.J. (1997).** *Parasitic wasps*. London: Chapman & Hall.
- **Quicke, D.L.J., Fitton, M.G., Tunstead, J.R., Ingram, S.N., & Gaitens, P.V. (1994).** Ovipositor structure and relationships within the Hymenoptera, with special reference to the Ichneumonidae. *Journal of Natural History*, 28, 635-682.
- **Quicke, D.L.J., LeRalec, A., & Vilhelmsen, L. (1999).** Ovipositor structure and function in the parasitic Hymenoptera with an exploration of new hypotheses. *Atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Rendiconti*, 47, 197-239.
- **Quicke, D.L.J., Palmer-Wilson, J., Burrough, A., & Broad, J.R. (2004).** Discovery of calcium enrichment in cutting teeth of parasitic wasp ovipositors (Hymenoptera:Ichneumonoidea). *African Entomology*, 12, 259-264.
- **Quicke, D.L.J., Wyeth, P., Fawke, J.D., Basibuyuk, H.H., & Vincent, J.F.V. (1998).** Manganese and zinc in the ovipositors and mandibles of hymenopterous insects. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 124, 387-396.
- **Ramniwas, S., Kalja, B., Dev, K., & Parkash, R. (2013).** Direct and correlated responses to laboratory selection for body melanization in *Drosophila melanogaster*: Support for the melanization-desiccation resistance hypothesis. *Journal of Experimental Biology*, 216, 1244-1254. doi: 10.1242/jeb.076166
- **Rapti, Z., Duennes, M.A., & Cameron, S.A. (2014).** Defining the colour pattern phenotype in bumble bees (*Bombus*): A new model for evo devo. **Biological Journal of the Linnean Society**, 113, 384-404. DOI: 10.1111/bij.12356
- **Rasnitsyn, A.P. (1980).** Origin and evolution of Hymenoptera. *Transactions of the Paleontological Institute of the Academy of Sciences of the USSR*, 174, 1–192.
- **Rasnitsyn, A.P., & Quicke, D.L.J. (2002).** *History of Insects* (Kluwer Academic Publishers).
- **Ravaiano, S.V., de Paiva Ferreira, R., de Oliveira Campos, L.A., & Martins, G.F. (2014).** The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. *Naturwissenschaften*, 101(8), 603–11. PMID:24861136
- **Richardson, F. (1942).** Adaptive modifications for tree-trunk foraging in birds. *University California Publications Zoology*, 46, 317-368.

- **Ricklefs, R.E., & Cox, G.W. (1977).** Morphological similarity and ecological overlap among passerine birds on St. Kitts, British West Indies. *Oikos*, 29, 60-66.
- **Ricklefs, R.E., & Miles, D.B. (1994).** *Ecological and Evolutionary Inferences from Morphology: an Ecological Perspective. Pages 13-41 in P.C. Wainwright and S. M. Reilly, editors. Ecological morphology. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.*
- **Riddle, O. (1909).** Our knowledge of melanin color formation and its bearing on the Mendelian description of heredity. *The Biological Bulletin*, 16, 316-351.
- **Riley, P.A. (1997).** Melanin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29, 1235-1239. doi:10.1016/S1357-2725(97)00013-7
- **Riveros, A.J., & Gronenberg, W. (2010).** Sensory allometry, foraging task specialization and resource exploitation in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64, 955–966.
- **Robbirt, K.M., Davy, A.J., Hutchings, M.J., & Roberts, D.L. (2011).** Validation of biological collections as a source of phenological data for use in climate change studies: A case study with the orchid *Ophrys sphegodes*. *Journal of Ecology*, 99(1), 235-241.
- **Robertson, D.J., & Gandhi, K.J.K. (2018).** Morphology of Male and Female Antennal Sensilla of *Ibalia leucospoides ensiger* (Hymenoptera: Ibalidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 111, 1, (13).
- **Rodriguez, J., Fernández-Triana, J., Smith, M., Janzen, D., Hallwachs, W., Erwin, T., Whitfield, J., Leather, S., & Quicke, D. (2013).** Extrapolations from field studies and known faunas converge odramatically increased estimates of global microgastrine parasitoid wasp species richness (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Conservation and Diversity*, 6(4), 530-536.
- **Roff, D.A. (1992).** *The evolution of life histories*. Chapman & Hall, New York.
- **Romani, R., Rondoni, G., Gragnoli, L., Pergolari, P., Santinelli, C., Stacconi, M.V.R., & Ricci, C. (2010).** Indagini bio-etologiche e morfologiche su *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*, Anno LVIII: 97–104.
- **Ronquist, F. (1994).** Evolution of parasitism among closely related species: phylogenetic relationships and the origin of inquilinism in gall wasps (Hymenoptera, Cynipidae). *Evolution*, 48, 241-266.
- **Ronquist, F. (1995).** Phylogeny and early evolution of the Cynipoidea (Hymenoptera). *Systematic Entomology*, 20, 309-335.
- **Ronquist, F. (1999).** Phylogeny, classification and evolution of the Cynipoidea. *Zoologica Scripta*, 28, 139-164.

- **Ronquist, F., Klopfstein, S., Vihelmsen, L., Schulmeister, S., Murray, D.L., & Rasnitsyn, A.P. (2012).** *A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the Hymenoptera.* *Systematic Biology*, 61, 973-999.
- **Ronquist, F. & Liljeblad, J. (2001).** Evolution of the gall wasp–host plant association. *Evolution*, 55, 2503–2522.
- **Ronquist, F., Nieves-Aldrey, J.L., Buffington, M.L, Liu, Z., Liljeblad, J., & Nylander, J.A.A. (2015).** Phylogeny, Evolution and Classification of Gall Wasps: The Plot Thickens. *PLoS ONE*, 10(5), e0123301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123301>
- **Ronquist, F., & Nordlander, G. (1989).** Skeletal morphology of an archaic cynipoid, *Ibalia rufipes* (Hymenoptera: Ibalidae). *Entomologica Scandinavica Supplement*, 33, 1-60.
- **Roomans, G.M. (1988).** Quantitative X-ray microanalysis of biological specimens. *Journal of Electron Microscopy* Technique 9, 19-43.
- **Roomans, G.M., Wroblewski, J., & Wroblewski, R. (1988).** Elemental microanalysis of biological specimens. *Scanning Microscopy*, 2, 937-946.
- **Rosen, H.V. (1958).** Zur kenntnis der europaischen Arten des Pteromaliden gattung *Mesopolobus* Westwood, 1833. (Hymenoptera: Chalcidoidea). Opuse. *Entomology*, 23, 203-240.
- **Rota, J. (2005).** Larval and Pupal Descriptions of the Neotropical Choreutid Genera *Rhobonda* Walker and *Zodia Heppner* (Lepidoptera: Choreutidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98(1), 37-47.
- **Roulin, A. (2004).** The evolution, maintenance and adaptive function of genetic colour polymorphism in birds. *Biological Reviews*, 79, 815–848. DOI: 10.1017/S1464793104006487.
- **Roulin, A., Mafli, A., & Wakamatsu, K. (2013).** Reptiles produce pheomelanin: evidence in the Eastern Hermann's Tortoise (*Eurotestudo boettgeri*). *Journal of Herpetology*, 47, 258–261. doi: <http://dx.doi.org/10.1670/12-028>
- **Roux, O., van Baaren, J., Gers, C., Arvanitakis, L., & Legal, L. (2005).** Antennal structure and oviposition behavior of the *Plutella xylostella* specialist parasitoid: *Cotesia plutellae*. *Microscopy Research and Technique*, 68, 36–44.
- **Rozanowska, M., Sarna, T., Land, E.J., & Truscott, T.G. (1999).** Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 518–525. doi:10.1016/S0891-5849(98)00234-2

- Ruchty, M., Romani, R., Kübler, L.S., Ruschioni, S., Roces, F., Isidoro, N., & Kleineidam, C.J. (2009). The thermo-sensitive sensilla coeloconica of leaf-cutting ants (*Atta vollenweideri*). *Arthropod Structure & Development*, 38, 195-205.
- Rundell, R.J., & Price, T.D. (2009). Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 394–399. doi: 10.1016/j.tree.2009.02.007.
- Sadd, B.M., Barribeau, S.M., Bloch, G., de Graaf, D.C., Dearden, P., Elsik, C.G., Gadau, J., Grimmelikhuijzen, C.J., Hasselmann, M., Lozier, J.D., Robertson, H.M., Smagghe, G., Stolle, E., Van Vaerenbergh, M., Waterhouse, R.M., Bornberg-Bauer, E., Klasberg, S., Bennett, A.K., Câmara, F., Guigó, R., Hoff, K., Mariotti, M., Munoz-Torres, M., Murphy, T., Santesmasses, D., Amdam, G.V., Beckers, M., Beye, M., Biewer, M., Bitondi, M.M., Blaxter, M.L., Bourke, A.F., Brown, M.J., Buechel, S.D., Cameron, R., Cappelle, K., Carolan, J.C., Christiaens, O., Ciborowski, K.L., Clarke, D.F., Colgan, T.J., Collins, D.H., Cridge, A.G., Dalmay, T., Dreier, S., du Plessis, L., Duncan, E., Erler, S., Evans, J., Falcon, T., Flores, K., Freitas, F.C., Fuchikawa, T., Gempe, T., Hartfelder, K., Hauser, F., Helbing, S., Humann, F.C., Irvine, F., Jermiin, L.S., Johnson, C.E., Johnson, R.M., Jones, A.K., Kadowaki, T., Kidner, J.H., Koch, V., Köhler, A., Kraus, F.B., Lattorff, H.M., Leask, M., Lockett, G.A., Mallon, E.B., Antonio, D.S., Marxer, M., Meeus, I., Moritz, R.F., Nair, A., Näpflin, K., Nissen, I., Niu, J., Nunes, F.M., Oakeshott, J.G., Osborne, A., Otte, M., Pinheiro, D.G., Rossié, N., Rueppell, O., Santos, C.G., Schmid-Hempel, R., Schmitt, B.D., Schulte, C., Simões, Z.L., Soares, M.P., Swevers, L., Winnebeck, E.C., Wolschin, F., Yu, N., Zdobnov, E.M., Aqrawi, P.K., Blankenburg, K.P., Coyle, M., Francisco, L., Hernandez, A.G., Holder, M., Hudson, M.E., Jackson, L., Jayaseelan, J., Joshi, V., Kovar, C., Lee, S.L., Mata, R., Mathew, T., Newsham, I.F., Ngo, R., Okwuonu, G., Pham, C., Pu, L.L., Saada, N., Santibanez, J., Simmons, D., Thornton, R., Venkat, A., Walden, K.K., Wu, Y.Q., Debyser, G., Devreese, B., Asher, C., Blommaert, J., Chipman, A.D., Chittka, L., Fouks, B., Liu, J., O'Neill, M.P., Sumner, S.
- Puiu, D., Qu, J., Salzberg, S.L., Scherer, S.E., Muzny, D.M., Richards, S., Robinson, G.E., Gibbs, R.A., Schmid-Hempel, P., & Worley, K.C. (2015). The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organisation. *Genome Biology*, 16, 76. doi: 10.1186/s13059-015-0623-3
- Saenko, S., Teyssier, J., van der Marel, D., & Milinkovitch, M.C. (2013). Precise colocalization of interacting structural and pigmentary elements generates extensive color pattern variation in *Phelsuma* lizards. *BMC Biology*, 11, 105. DOI: 10.1186/1741-7007-11-105
- Sanchez-Munoz, L., Bustillo, M.A., Garcia-Guinea, J., Crespo-Feo, E., & Tormo, L. (2009). *Mineral characterization of silicified coral from western Sumatra (Indonesia)*. In: Gucsik, A. (Ed). Micro-Raman

- Spectroscopy and Luminescence Studies in the Earth and Planetary Sciences. Mainz: American Institute of Physics, pp 115-120.
- **Schaefer, S.A., & Lauder, G.V. (1986).** Historical Transformation of Functional Design: Evolutionary Morphology of Feeding Mechanisms in Loricarioid Catfishes. *Systematic Zoology*, 35(4), 489-508.
 - **Schauff, M. (2001).** Taxonomy and ecology of Costa Rican *Euplectrus* (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoids of caterpillars (Lepidoptera). *Journal of Hymenoptera Research*, 10(2), 181-230.
 - **Schluter, D., & Losos, J.B. (2000).** Analysis of an evolutionary species–area relationship. *Nature*, 408(6814), 847-850.
 - **Schneider, A., David, V.A., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., Barsh, G.S., Menotti-Raymond, M., & Eizirik, E. (2012).** How the leopard hides its spots: ASIP mutations and melanism in wild cats. *PLoS ONE*, 7, e50386. doi:10.1371/journal.pone.0050386.
 - **Schofield, R., & Lefevre, H. (1989).** High concentrations of zinc in the fangs and manganese in the teeth of spiders. *Journal of Experimental Biology*, 114, 577-581.
 - **Schofield, R.M.S. (2001).** *Metals in cuticular structures*. In: Brownell P, Polis G, editors. Scorpion biology and research. Oxford: Oxford University Press. pp 234-256.
 - **Schofield, R.M.S. (2005).** *Metal–halogen biomaterials*. *American Entomologist*, 51, 45-47.
 - **Schofield, R.M.S., Nesson, M.H. & Richardson, K.A. (2002).** Tooth hardness increases with zinc-content in mandibles of young adult leaf-cutter ants. *Naturwissenschaften*, 89, 579-583.
 - **Schofield, R.M.S., Nesson, M.H., Richardson, K.A., & Wyeth, P. (2003).** Zinc is incorporated into cuticular “tools” after ecdysis: The time course of the zinc distribution in “tools” and whole bodies of an ant and a scorpion. *Journal of Insect Physiology*, 49, 31-44.
 - **Schofield, R.M.S., Postlethwait, J.H., & Lefevre, H.W. (1997).** MeV-ion microprobe analyses of whole *Drosophila* suggest that zinc and copper accumulation is regulated storage not deposit excretion. *Journal of Experimental Biology*, 200, 3235-3243.
 - **Schowalter, T.D. (2013).** *Insects and Sustainability of Ecosystem Services*. CRC Press/Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL.
 - **Searcy, W.A., & Nowicki, S. (2005).** *The evolution of communication: reliability and deception in animal signaling systems*. Princeton University Press, Princeton.
 - **Selman, Colin., Blount, J.D., Nussey, D.H., & Speakman, J.R. (2012).** Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: Where now? *Trends in Ecology & Evolution*, 27(10), 570-577.

- **Seltmann, K.C., Penzes, Z., Yoder, M.J., Bertone, M.A., & Deans, A.R. (2013).** Utilizing Descriptive Statements from the Biodiversity Heritage Library to Expand the Hymenoptera Anatomy Ontology. *PloS ONE*, 8(2), E55674.
- **Shamim, G., Ranjan, S., Pandey, D., & Ramani, R. (2014).** Biochemistry and biosynthesis of insect pigments. *European Journal of Entomology*, 111, 149-164. doi: 10.14411/eje.2014.021
- **Shang, L., Wang, Y., Wang, P., Wang, S., & Ren, B. (2010).** Application of rough set analysis in species and caste discrimination of bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) based on antennal sensilla. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(4), 654–660.
- **Sharkey, M.J. (2007).** Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*, 1668, 521-548
- **Sharkey, M.J., Carpenter, J.M., Vihelmsen, L., Heraty, J., Liljeblad, J., Dowling, A.P.G., Schulmeister, S., Murray, D.L., Deans, A.R., Ronquist, F., Krogmann L., & Wheeler, .C. (2012).** Phylogenetic relationships among superfamilies of Hymenoptera. *Cladistics*, 28, 80-112.
- **Sharma, K.R., Enzmann, B.L., Schmidt, Y., Moore, D., Jones, G.R., Parker, J., Berger, S.L., Reinberg, D., Zwiebel, L.J., Breit, B., Liebig, J., & Ray, A. (2015).** Cuticular hydrocarbon pheromones for social behavior and their coding in the ant antenna. *Cell Reports*, 12, 1261–1271.
- **Shear, W. (2012).** *Pyргеuma pyrgodesmoides*, n. gen., n. sp., a new millipede from Malaysia with unusual surface structures (Diplopoda, Chordeumatida, Heterochordeumatidae). *Zootaxa*, (3560), 79-86.
- **Silva de Moraes, R.L.M., & Da Cruz-Landim, C. (1972).** Estuda comparative de orgaos sensoriais em abelhas corn diferentes tipos de comunicaclo. *Revista Brasileira de Biologia*, 32, 185-96.
- **Silveira, O.T., & Santos Jr. J.N.A. (2011).** Comparative morphology of the mandibles of female polistine social wasps (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(4), 479-500.
- **Simmons, L.W., Tomkins, J.L., & Alcock, J. (2000).** Can minor males of Dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni* (Hymenoptera: Anthophorini) compensate for reduced access to virgin females through sperm competition? *Behavioral Ecology*, 11, 319–325.
- **Simon, J.D., & Peles, D.N. (2010).** The red and the black. *Accounts of Chemical Research*, 43, 1452-1460. DOI: 10.1021/ar100079y
- **Smadja, C., & Butlin, R.K. (2009).** On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in pre mating isolation. *Heredity*, 102, 77-97.
- **Socrates, G. (2004).** *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts (3rd edition)*. John Wiley & Sons, Chichester.

- **Somanathan, H., Kelber, A., Borges, R., Wallen, R., & Warrant, E.J. (2009).** Visual ecology of Indian carpenter bees II: adaptations of eyes and ocelli to nocturnal and diurnal lifestyles. *Journal of Comparative Physiology A*, 195, 571-583
- **Spaethe, J., Brockmann, A., Halbig, C., & Tautz, J. (2007).** Size determines antennal sensitivity and behavioral threshold to odors in bumblebee workers. *Naturwissenschaften*, 94(9), 733–9.
- **Speiser, D.I., DeMartini, D.G., & Oakley, T.H. (2014).** The shelleyes of the chiton *Acanthopleura granulata* (Mollusca, Polyplacophora) use pheomelanin as a screening pigment. *Journal of Natural History*, 48, 2899–2911. DOI: 10.1080/00222933.2014.959572.
- **Stavenga, D.G., Leertouwer, H.L., Hariyama, T., De Raedt, H.A., & Wilts, B.D. (2012).** Sexual dichromatism of the damselfly *Calopteryx japonica* caused by a melanin-chitin multilayer in the male wing veins. *PLoS ONE*, 7, e49743. DOI: 10.1371/journal.pone.0049743.
- **Stein, G. (1961).** Untersuchungen über den gelben Farbstoff in den Haaren der Hummel *Bombus terrestris* L. *Zeitschrift für Naturforschung*, 16B, 129-134.
- **Stewart, A.D., Anand, R.R., Laird, J.S., Verrall, M., Ryan, C.G., de Jonge, M.D., Paterson, D., & Howard, D.L. (2011).** Distribution of Metals in the Termite *Tumulitermes tumuli* (Froggatt): Two Types of Malpighian Tubule Concretion Host Zn and Ca Mutually Exclusively. *PLoS ONE*, 6(11), e27578. doi:10.1371/journal.pone.0027578
- **Stevens, P.F. (1991).** *Character states, Morphological Variation, and Phylogenetic Analysis: A Review*. Published by: American Society of Plant Taxonomist. *Systematic Botany*, 16, (3), pp 553-583
- **Stoltz, D.B., & Vinson, S.B. (1979).** *Advances in virus research*. (Advances in Virus Research Volume 24). New York : Academic Press.
- **Stone, G.N., & Cook, J.M. (1998).** The structure of cynipid oak galls: patterns in the evolution of an extended phenotype. *Proceedings of the Royal Society of London. B: Biological Sciences*, 265, 979-988.
- **Stone, G.N., Hernandez-Lopez, A., Nicholls, J.A., di Pierro, E., Pujade-Villar, J., Melika, G., & Cook, J.M. (2009).** *Extreme host plant conservatism during at least 20 million years of host plant pursuit by oak gallwasps*. *Evolution*, 63, 854-869.
- **Stone, G.N., & Schönrogge, K. (2003).** The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 512-522.
- **Stone, G.N., Schönrogge, K., Atkinson, R., Bellido, D., & Pujade-Villar, J.** The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera, Cynipidae). *Annual Review of Entomology*, 47, 633–668. PMID: 11729087.

- **Stork, N.E. (1988).** Insect diversity: facts, fiction and speculation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 35, 321-337.
- **Stork, N.E. (2017).** How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annual Review of Entomology*, 63, 31-45
- **Stork, N.E., McBroom, J., Gely, C., & Hamilton, A.J. (2015).** New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 7519-23
- **Streinzer, M., Brockmann, A., Nagaraja, N., & Spaethe, J. (2013a).** Sex and caste-specific variation in compound eye morphology of five honeybee species. *PLoS ONE*, 8, e57702.
- **Streinzer, M., Kelber, C., Pfabigan, S., Kleineidam, C.J., & Spaethe, J. (2013b).** Sexual dimorphism in the olfactory system of a solitary and a eusocial bee species. *Journal of Comparative Neurology*, 521, 2742-2755.
- **Symonds, M.R.E., & Elgar, M.A. (2013).** The Evolution of Body Size, Antennal Size and Host Use in Parasitoid Wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea): A Phylogenetic Comparative Analysis. *PLoS ONE*, 8(10), e78297
- **Tabata, H., Hasegawa, T., Nakagoshi, M., Takikawa, S., & Tsusue, M. (1996).** "Occurrence of biopterine in the wings of Morpho butterflies." *Cellular and Molecular Life Sciences*, 52 (1), 85-87.
- **Todd, J.L., & Baker, T.C. (1999).** *Function of peripheral olfactory organs*. In: Hansson BS, editor. *Insect Olfaction*. Berlin: Springer. pp 67-96.
- **Torgerson, W.S. (1952).** Multidimensional scaling: I. Theory and method. *Psychometrika*, 17, 401-419.
- **Tormos, J., de Pedro, L., Beitia, F., Sabater, B., Asís J.D., & Polidori C. (2013).** Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in *Aganaspis* parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies. *Microscopy and Microanalysis*, 19, 1475-1489.
- **Umebachi, Y. (1985).** Papiliochrome, a new pigment group of butterfly. *Zoological Science*, 2, 163-174.
- **Umebachi, Y., & Yoshida, K. (1970).** Some chemical and physical properties of papiliochrome II in the wings of *Papilio xuthus*. *Journal of Insect Physiology*, 16, 1203-1228.
- **Unruh, T.R., & Messing, R.H. (1993).** *Intraspecific biodiversity in Hymenoptera: implications for conservation and biological control*. In: Lasalle, J., Gauld, I.D. (Eds.), *Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, Wallingford, UK.
- **van Baaren, J., Barbier, R., & Nénon, J.P. (1996).** Females antennal sensilla of *Epidinocarsis lopezi* and *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), parasitoids of pseudococcid mealybugs. *Canadian Journal of Zoology*, 74, 710-720.

- **van Baaren, J., Boivin, G., Bourdais, D., & Roux, O. (2007).** *Antennal sensilla of hymenopteran parasitic wasps: variations linked to host exploitation behavior.* In: Mendez Vilas A, Diaz Alvarez J, editors. Modern research and educational topics in microscopy. Badajoz: Formatex. pp 345–352.
- **van Baaren, J., Boivin, G., Le Lannic, J., & Nénon, J.P. (1999).** Comparison of antennal sensilla of *Anaphes victus* and *A. listronoti* (Hymenoptera, Mymaridae), egg parasitoids of Curculionidae. *Zoomorphology*, 119, 1–8.
- **van der Klauuw, C.J. (1948).** Ecological studies and reviews. IV. Ecological Morphology. *Bibliotheca Biotheoretica*, 4, 27-11.
- **Veijalainen, A., Sääksjärvi, I., Erwin, T., Gómez, I., & Longino, J. (2013).** Subfamily composition of Ichneumonidae (Hymenoptera) from western Amazonia: Insights into diversity of tropical parasitoid wasps. *Insect Conservation and Diversity*, 6(1), 28-37.
- **Vernon-Parry, K.D., Davies, G., & Galloway, S. (2005).** Electronic and structural properties of grain boundaries in electron-irradiated edge-defined film-fed growth silicon. *Semiconductor Science and Technology*, 20, 171-174.
- **Viggiani, G., & Mazzone, P. (1982).** Antennal sensilla of some *Encarsia* Foerster (Hymenoptera: Aphelinidae) with particular reference to sensorial complexes of the male. *Bolletino del Laboratorio di Entomologia e Agraria. "Filippo Silvestri"*, 39, 19–26.
- **Vigneron, J.P., Kertész, K., Vértesy, Z., Rassart, M., Lousse, V., Bálint, Z., & Biró, L.P. (2008).** Correlated diffraction and fluorescence in the backscattering iridescence of the male butterfly *Troides magallanus* (Papilionidae). *Physical Review E*, 78, 021903.
- **Vilhemsen, L., Mikó, I., & Krogmann, L. (2010).** Beyond the wasp-waist: structural diversity and phylogenetic significance of the mesosoma in apocritan wasps (Insecta: Hymenoptera). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 159, 22-194
- **Vincent, J.F.V. (2002).** Arthropod cuticle – a natural composite shell system. *Composites Part. A: Applied Science and Manufacturing*, 33, 1311-1315.
- **Vincent, J.F.V. (2009).** If it's tanned it must be dry: a critique. *Journal of Adhesion*, 85, 755–69.
- **Vincent, J.F.V., & King, M.J. (1995).** The mechanism of drilling by wood wasp ovipositors. *Biomimetics*, 3, 187-201.
- **Vincent, J.F.V., & Wegst, U. (2004).** Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct. Dev.*, 33, 187-199.
- **Vittinghoff, E., Glidden, D.V., Shiboski, S.C., & McCulloch, C.E. (2011).** *Regression Methods in Biostatistics.* New York: Springer. 509 pp.

- **Viviani, V.R. (2002).** The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1833-1850.
- **Voegelé, J., Cals-Usciat, J., Pihan, J.P., & Daumal, J. (1975).** Structure de l'antenne femelle des *Trichogrammes*. *Entomophaga*, 20, 161–169.
- **Vogt, O. (1911).** Studien über das Artproblem. 2. Mitteilung. Über das Variieren der Hummeln. 2. Teil. (Schluss). *Sitzungsberichte der Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin*, 1911, 31-74.
- **Vukusic, P., & Hooper, I. (2005).** Directionally controlled fluorescence emission in butterflies. *Science*, 310, 1151.
- **Wainwright, P.C. (1991).** Ecomorphology: Experimental functional anatomy for ecological problems. *American Zoology*, 31, 680—693.
- **Walther, J.R. (1983).** Antennal patterns of sensilla of the Hymenoptera - a complex character of phylogenetic reconstruction. *Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*. 26, 373–392.
- **Wang, X-Y., Yang, Z-Q., & Gould, J.R. (2010).** Sensilla on the antennae, legs and ovipositor of *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the emerald ash borer *Agrilus planipennis* Fairmaire (Coleoptera: Buprestidae). *Microscopy Research and Technique*, 73, 560–571.
- **Ware, A.B., & Compton, S.G. (1992).** Repeated evolution of elongate multiporous plate sensilla in female fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae, Agaoninae). *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, 95, 275–292.
- **Wcislo, W.T. (1995).** Sensilla numbers and antennal morphology of parasitic and non-parasitic bees (Hymenoptera: Apoidea). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28, 63–81.
- **Weisser, W. W., & Siemann, E. (2004).** *Insects and Ecosystem Function*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 3-24
- **Whitehead, A. T., & Larsen J. L. (1976).** Ultrastructure of the contact chemoreceptors of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 5, 301-15.
- **Whitfield, J.B. (1998).** **Phylogeny and Evolution** of Host-parasitoid interactions in Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 43, 129-51
- **Whitfield, J.B., Jhonson, N.F., & Hamerski, M.R. (1989).** Identity and phylogenetic significance of the metapostnotum in nonaculeate Hymenoptera. *Annals of the Entomological Society of America*, 82, 663-73

- **Whitmore, D. (2009).** A review of the *Sarcophaga* (Heteronychia) (Diptera: Sarcophagidae) of *Sardinia*. *Zootaxa*, 2318, 566–588.
- **Whitmore, D. (2011).** New taxonomic and nomenclatural data on *Sarcophaga* (Heteronychia) (Diptera: Sarcophagidae), with description of six new species. *Zootaxa*, 2778, 1-57.
- **Wiens, J.A., & Rotenberry, J.T. (1980).** Patterns of morphology and ecology in grassland and shrubsteppe bird populations. *Ecological Monographs*, 50, 287-308.
- **Wijnen, B., Leertouwer, H.L., & Stavenga, D.G. (2007).** Colors and pterin pigmentation of pierid butterfly wings. *Journal of Insect Physiology*, 53, 1206–1217.
- **Wikramanayake, E.D. (1990).** Ecomorphology and biogeography of a tropical stream fish assemblage: Evolution of assemblage structure. *Ecology*, 71, 1756-1764.
- **Willander, M., Nur, O., Zhao, Q.X., Yang, L.L., Lorenz, M., Cao, B.Q., Zuniga Perez, J., Czekalla, C., Zimmermann, G., Grundmann, M., Bakin, A., Behrends, A., Al-Suleiman, M., Al-Shaer, A., Che Mofor, A., Postels, B., Waag, A., Boukos, N., Travlos, A., Kwack, H.S., Guinard, J., & Le Si Dang, D. (2009).** Zinc oxide nanorods based photonic devices: Recent progress in growth, light emitting diodes and lasers. *Nanotechnology*, 20, 332001.
- **Williams, N. M., & K. Goodell. (2000).** Association of mandible shape and nesting material in *Osmia* Panzer (Hymenoptera: Megachilidae): a morphometric analysis. *Annals of the Entomological Society of America*, 93, 318-325.
- **Williams, P.H. (2007).** The distribution of bumblebee colour patterns world-wide: Possible significance for thermoregulation, crypsis, and warning mimicry. *Biological Journal of the Linnean Society*, 92, 97–118. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2007.00878.x
- **Wilson, E. (1971).** Social Insects. *Science*, 172(3981), 406.
- **Winemiller, K.O. (1991).** Ecomorphological diversification in lowland freshwater fish assemblages from five biotic regions. *Ecological Monographs*, 61, 343-365.
- **Wirkner, C., & Richter, S. (2010).** Evolutionary morphology of the circulatory system in Peracarida (Malacostraca; Crustacea). *Cladistics the International Journal of the Willi Hennig Society*, 26(2), 143-167.
- **Wittkopp, P.J., & Beldade, P. (2009).** Development and evolution of insect pigmentation: genetic mechanisms and the potential consequences of pleiotropy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 65–71. doi:10.1016/j.semcdb.2008.10.002

- **Wittkopp, P.J., Carroll, S.B., & Kopp, A. (2003).** Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. *Trends in Genetics*, 19, 495–504. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00194-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00194-X).
- **Wittwer, B., Hefetz, A., Simon, T., Murphy, L.E.K., Elgar, M.A., Pierce, N.E., & Kocher, S.D. (2017).** Solitary bees reduce investment in communication compared with their social relatives. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114, 6569–6574.
- **Wolnicka-Glubisz, A., Pecio, A., Podkowa, D., Kolodziejczyk, L.M., & Plonka, P.M. (2012).** Pheomelanin in the skin of *Hymenochirus boettgeri* (Amphibia: Anura: Pipidae). *Experimental Dermatology*, 21, 537–540. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01511.x.
- **Xi, Y.Q., Yin, X.M., Zhu, C.D., Guerrieri, E., & Zhang, Y.Z. (2011).** Scanning electron microscopy studies on antennal sensilla of *Ooencyrtus phongi* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Microscopy Research and Technique*, 74, 936–945.
- **Yeh, S.-D., Liou, S.-R., & True, J.R. (2006).** Genetics of divergence in male wing pigmentation and courtship behavior between *Drosophila elegans* and *Drosophila gunungcola*. *Heredity*, 96, 383–395. doi:10.1038/sj.hdy.6800814.
- **Yoder, M.J., Mikó, I., Seltmann, K.C., Bertone, M.A. & Deans, A.R. (2010).** A Gross Anatomy Ontology for Hymenoptera. *PLoS ONE*, 5(12): e15991
- **Zacharuk, R.Y. (1985).** *Antennae and sensilla*. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol 6. Oxford: Pergamon. pp 1–69.
- **Zacharuk, R.Y., & Shields, V.D. (1991).** Sensilla of immature insects. *Annual Review of Entomology*, 36, 331–354.
- **Zecca, L., Gallorini, M., SchuÈnemann, V., Trautwein, A.X., Gerlach, M., Riederer, P., Vezzoni, P., & Tampellini, D. (2001).** Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *Journal of Neurochemistry*, 76, 1766–1773. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00186.x.
- **Zhao, Z.L., Zhao, H.P., Ma, G.J., Wu, C.W., Yang, K., & Feng, X.Q. (2015).** Structures, properties, and functions of the stings of honey bees and paper wasps: a comparative study. *Biology Open*, 4, 921–928.
- **Zhou, H., Wu, W.-J., Li-Ming, N., & Yue-Guan, F. (2013).** Antennal sensilla of female *Encarsia guadeloupae* Viggiani (Hymenoptera: Aphelinidae), a nymphal parasitoid of the spiraling whitefly *Aleurodicus dispersus* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Micron*, 44, 365–372.

- **Zufelato, M.S., Lourenco, A.P., Simões, Z.L., Jorge, J.A., & Bitondi, M.M. (2004).** Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 1257-1268. doi:10.1016/j.ibmb.2004.08.005.



“En mi opinión, lo único que necesitaba la fe es el convencimiento de que esforzándonos en hacer lo mejor que podemos nos acercaremos al éxito, y que el éxito de nuestros propósitos, la mejora de la humanidad de hoy y del futuro, merece la pena conseguirse”.

Rosalind Franklin

XI

Listado de publicaciones

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS EN EL JOURNAL CITATIONS REPORTS (JCR).

- **Jorge A.**, Polidori C. & Nieves-Aldrey J. L. (2016) Pheomelanin in the secondary sexual characters of male parasitoid wasps (Hymenoptera: Pteromalidae). *Arthropod Structure & Development*, 45: 311-319. IF=1.546
- **Jorge A.**, Polidori C., Garcia-Guinea J. & Nieves-Aldrey J. L. (2017) Spectral cathodoluminescence analysis of hymenopteran mandibles with different levels of zinc enrichment in their teeth. *Arthropod Structure & Development*, 46: 39-48. IF=1.546
- Polidori C., **Jorge A.** & Ornosá C. (2017) Eumelanin and pheomelanin are predominant pigments in bumblebee (Apidae: *Bombus*) pubescence. *PEER J*, 5:e3300, <https://doi.org/10.7717/peerj.3300>. IF=2.177

ARTÍCULOS ENVIADOS Y BAJO EVALUACIÓN:

- **Jorge A.**, Polidori C. & Nieves-Aldrey J. L. (*submitted*) Antennal sensilla in male gall-wasps and insights on the evolution of sexual dimorphism in sensory equipment (Hymenoptera: Cynipidae). *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 46: 39-48. IF=2.357

ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN PARA SU PRÓXIMA PUBLICACIÓN:

- **Jorge A.**, Polidori C. & Ornosá C. (*en preparación*) Smelling the right plant: is there a link between pollen specialization and peripheral sensory system in bees?
- **Jorge A.**, Polidori C., Ornosá C., Tormos J., Asís J. D., Nieves-Aldrey J. L. (*en preparación*) Zn and Mn incorporation in the mandibles of Hymenoptera (Insecta): an adaptation to certain life-history traits?

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS:

- **Jorge A.**, Polidori C. & Nieves-Aldrey J.L. (2016) Morphological diversity of sex pheromone-spreading structures in the antennae of male gall-wasps and their relatives (Hymenoptera: Cynipoidea). Poster, XVII Congreso Ibérico de Entomología, Lisboa – 5-8 Septiembre 2016.
- Polidori C., **Jorge A.**, Ornosá C. (2016) Two types of melanin as prevalent pigments in bumblebee body hairs (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). Poster, XVII Congreso Ibérico de Entomología, Lisboa – 5-8 Septiembre 2016.
- Polidori C., **Jorge A.**, Ornosá C., Tormos J., Asís J.D., Nieves-Aldrey J-L. (2017) Possible life-history traits linked with zinc incorporation in the mandibles of the hyper-diverse Hymenoptera. Poster, XXXIII Jornadas de la Asociación Española de Entomología, Almería, 15-18 Noviembre 2017.

- **Jorge A.**, Polidori C., Ormosa C. (2017) Antennal sensillar equipment in bees (Apoidea): new data from quantitatively unexplored families. Poster, XXXIII Jornadas de la Asociación Española de Entomología, Almería, 15-18 Noviembre 2017.
- **Jorge A.**, Polidori C., Nieves-Aldrey J-L. (2017) Sexual dimorphism in antennal sensory system varies with life-history in gall-wasps (Hymenoptera: Cynipidae). Poster, XXXIII Jornadas de la Asociación Española de Entomología, Almería, 15-18 Noviembre 2017.