

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**MORFOLOGÍA COMPARATIVA DE LAS TIBIAS POSTERIORES  
MODIFICADAS DE LOS MACHOS EN CUATRO GÉNEROS DE ABEJAS  
EUGLOSINAS (APINAE: EUGLOSSINI)**

Y

**BIOLOGIA DE UNA LARVA POLINÍVORA, *Allograpta micrura* (DIPTERA:  
SYRPHIDAE), EN FLORES DE *Castilleja talamancensis*  
(SCHROPHULARIACEAE)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de postgrado en Biología para optar por el grado de Magíster Scientiae.

**Ju Lin Weng Huang**

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio", Costa Rica

2005

## **Dedicatoria**

A mis padres, hermanos y maestros.

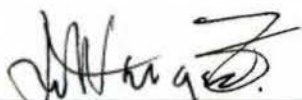
## **Agradecimientos**

A todas las personas que contribuyeron y compartieron conmigo este período de búsqueda y crecimiento. Mi eterno agradecimiento a mis profesores Paul Hanson, William Eberhard y Daniel Briceño por las enseñanzas, el apoyo y sobre todo por darme la oportunidad de encontrar a mi misma en la investigación. A mis amigos y colegas del laboratorio 170, mi otro hogar, gracias por su amistad, ayuda y compartir momentos valiosos durante estos años. Mil gracias a Kenji Nishida por compartir su talento en la fotografía, conocimientos y experiencia en diversos grupos de insectos y valiosos tópicos de discusión; y a Leonora Rodríguez por compartir conmigo los conocimientos de Microscopía, su contagioso positivismo y su determinación para alcanzar los sueños y tierras más lejanas. A Maribel Vargas y Ethel Sánchez por las enseñanzas y su valiosa ayuda en el uso de los microscopios electrónicos. Al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica por facilitar los servicios de Microscopía Electrónica. A Manuel Zumbado por identificar los adultos de *Allograpta micrura* y su aporte de literatura valiosa y al Dr. Graham Rotheray por la descripción de la larva de *Allograpta micrura*. A Mónica Spinger y Charlotte Skove por su traducción de las literaturas en idioma alemán. A la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica por la beca de investigación y a la Agencia G.T.Z. por el financiamiento de la fase exploratoria en mis investigaciones en las abejas de las orquídeas.

A mi padres, mis hermanos Antonio, Andrea y Nien por el cariño, la confianza y el apoyo incondicional en todas mis aventuras.

A Gilbert Barrantes por su entusiasmo, tenacidad y su amor a la biología.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Postgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae*"



---

DR. JOSÉ VARGAS ZAMORA  
REPRESENTANTE DEL DECANO  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



---

Dr. PAUL HANSON SNORTUM  
DIRECTOR DE TESIS



---

Dr. WILLIAM EBERHARD CABTREE  
ASESOR



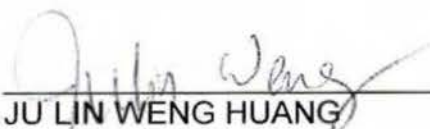
---

M.SC. DANIEL BRICEÑO LOBO  
ASESOR



---

Dr. FEDERICO BOLAÑOS VIVES  
REPRESENTANTE DEL DIRECTOR  
PROGRAMA DE POSTGRADO EN BIOLOGÍA



---

JU LIN WENG HUANG  
CANDIDATA

## ÍNDICE

Dedicatoria y Agradecimientos .....	ii
Hoja de presentación .....	iii
Índice .....	iv
Prefacio .....	viii
Resumen general .....	ix
Lista de cuadros .....	xvi
Lista de figuras .....	xvii
Lista de abreviaturas.....	xxiii
ARTÍCULO 1. Morfología comparativa de las tibias posteriores modificadas de los machos en cuatro géneros de abejas euglosinas (Apinae: Euglossini).....	1
Resumen .....	2
Palabras claves .....	3
Introducción .....	3
Materiales y métodos .....	6
Resultados .....	8
Morfología externa .....	8
Descripción general .....	8
Género <i>Euglossa</i> .....	10
Género <i>Eufriesea</i> .....	11
Género <i>Eulaema</i> .....	12
Género <i>Exaerete</i> .....	13
Morfología interna .....	14

Descripción general .....	14
Género <i>Euglossa</i> .....	18
Género <i>Eufriesea</i> .....	20
Género <i>Eulaema</i> .....	22
Género <i>Exaerete</i> .....	24
Discusión .....	25
Agradecimientos .....	32
Literatura citada .....	33
Cuadros .....	39
Cuadro 1 .....	39
Cuadro 2 .....	40
Lista de figuras .....	41
Figuras .....	45
Figura 1 .....	46
Figura 2 .....	47
Figura 3 .....	48
Figura 4 .....	49
Figura 5 .....	50
Figura 6 .....	51
Figura 7 .....	52
Figura 8 .....	53
Figura 9 .....	54

Figura 10 .....	55
Apéndice .....	56
Apéndice 1 .....	57
Artículo 2: Biología de una larva polinívora, <i>Allograpta micrura</i> (Diptera: Syrphidae), en flores de <i>Castilleja talamancensis</i> (Scrophulariaceae)....	58
Biology of a pollen feeding hoverfly larva, <i>Allograpta micrura</i> (Diptera: Syrphidae), on <i>Castilleja talamancensis</i> (Scrophulariaceae) .....	59
Summary .....	59
Key words .....	60
Introduction .....	60
Methods .....	61
Host plant .....	61
General description of the study sites .....	61
Taxonomy .....	62
Biology .....	62
Results .....	66
Description of the third stage larva and puparium .....	66
Egg and oviposition .....	68
Biology .....	68
Pupation .....	69
Larva – plant relationship .....	70

Search and feeding behavior .....	72
Defecation .....	75
Predation and parasitism .....	75
Adult biology .....	76
Discussion .....	77
Acknowledgements .....	81
Literature .....	82
Figures and tables .....	85
Figure 1.....	86
Figure 2 .....	88
Figure 3 .....	89
Figure 4 .....	90
Figure 5 .....	90
Figure 6 .....	91
Figure 7 .....	92
Table 1 .....	93
Table 2 .....	93
Table 3 .....	94

## PREFACIO

La presente tesis consiste en dos artículos científicos que tratan de tópicos diferentes, el primero es un estudio comparativo de la morfología de las tibias posteriores de cuatro géneros de machos de las abejas de las orquídeas (Euglossini); el segundo se trata sobre de la biología novedosa de la larva, *Allograpta micrura* (Syrphini), que se alimenta del polen en la planta endémica *Castilleja talamancensis*. El primer artículo fue escrito en idioma español siguiendo el formato sugerido de la revista Journal of Morphology, mientras que el segundo es en inglés y en formato de la revista Studia Dipterologica.



Ju Lin Weng Huang

Morfología comparativa de las tibias posteriores modificadas de los machos en cuatro géneros de abejas euglosinas (Apinae: Euglossini)

Biología de una larva polinívora, *Allograpta micrura* (Diptera: Syrphidae), en flores de *Castilleja talamancensis* (Scrophulariaceae)

Tesis de Maestría Biología. – San José, C.R.:

J. Weng. H., 2005.

118.:17 il. – 69 refs.

## RESUMEN GENERAL

### **Artículo 1. Morfología comparativa de las tibias posteriores modificadas de los machos en cuatro géneros de abejas euglosinas (Apinae: Euglossini).**

Machos de las abejas euglosinas son los únicos insectos conocidos que poseen la capacidad de almacenar compuestos exógenos dentro de sus tibias traseras. Estos compuestos incluyen terpenos, sesquiterpenos, terpenoides, alcoholes, indoles y otros compuestos aromáticos de cadenas pequeñas de carbono que los machos euglosinas recolectan en sustratos como flores, exudados de troncos y raíces, madera en descomposición, sobre hongos, excrementos y hasta emulsiones de DDT. Estos compuestos son recolectados por las patas anteriores y son llevados inmediatamente hasta las patas traseras e introducidos dentro de un saco cuticular ubicado dentro de las tibias posteriores. No es clara la función de los compuestos recolectados por los machos euglosinos. La hipótesis más popular propone que la mezcla de los compuestos fragantes es procesada y utilizada en la atracción y cortejo de las hembras.

Se llevó a cabo el estudio comparativo de la morfología interna y externa de la tibia posterior de cuatro géneros de machos euglosinas. Las patas traseras fueron examinadas bajo el estereoscopio para describir la tibia posterior a nivel de género. Tibias traseras de los machos fueron procesadas para observar su morfología interna utilizando técnicas de Microscopía de luz y

Microscopía Electrónica de Barrido; también se hicieron estudios histológicos usando Microscopía de Transmisión.

La tibia posterior de los machos euglosinos es una cavidad ensanchada que alberga un saco cuticular, el cual abarca hasta un 85 % del volumen interno de esta estructura, restringiendo la musculatura hacia el margen anterior de la tibia. Los resultados de este estudio muestran la existencia de un patrón general en las estructuras modificadas de la tibia entre los cuatro géneros examinados. Del exterior hacia el interior, estas modificaciones son: 1- una hendidura cuticular que se localiza en el margen posterior con un orificio localizado en la porción basal de la hendidura; 2- presencia de las “células gigantes” en la pared interna de la hendidura y 3- un saco con proyecciones en su pared interior y dobleces que forman cámaras internas. A partir de este esquema común cada género presenta variaciones particulares.

La forma del segmento tibial es ovalada en *Eufriesea*, *Eulaema* y *Exaerete*, aproximadamente dos veces más largas que anchas. Mientras que *Euglossa* tiene forma romboide, vista desde la superficie superior. Todos los géneros poseen una franja alargada en el margen posterior de la tibia. Esta franja consiste en una depresión cuticular alargada o una hendidura que está cubierta por pelos alargados. La hendidura está separada en dos zonas por un levantamiento cuticular y también se pueden distinguir por los pelos asociados a cada zona. Un orificio pequeño se encuentra cerca de este levantamiento y se encuentra cubierto por pelos planos que forman una especie de cortina.

El saco cuticular se conecta al exterior de la tibia únicamente a través de un tubo cuticular, de 0,3 a 0,5 mm de largo, que se invagina desde el orificio encontrado en la parte superior de la hendidura. Este orificio es ligeramente engrosado con respecto a la cutícula que la rodea y su borde es liso. El extremo basal del tubo es redondo y denso pero conforme se extiende hacia el extremo

distal (hacia el saco cuticular) éste puede aplanarse y se deforma como en las especies de *Euglossa*. No hay musculaturas asociadas a este tubo.

La profundidad de las depresiones de la hendidura difiere entre los géneros, sin embargo, la distribución de los pelos es bastante uniforme, pelos largos y planos recubren el orificio del tubo de entrada (semejante a una cortina) y pelos plumosos en el resto de la hendidura. La disposición de los pelos permite que estos sirvan de guía y transporte para los líquidos recolectados, los cuales son conducidos contra gravedad hacia el orificio que se localiza cerca del extremo basal de la hendidura. La pared interna de la hendidura presenta grupos de extensiones quitinosas cubiertas por células amorfas o en forma de columnas ("células gigantes") cuya cobertura difiere entre géneros. Estas células son de origen epitelial y se asocian casi exclusivamente a la pared interna de la hendidura. Las "células gigantes" parecen ser las responsables en la secreción de hidrocarburos (i.e. ceras) que recubren los pelos en las hendiduras que les permiten ser selectivas para el transporte de los líquidos recolectados. Se observaron canalículos que se proyectan desde la base de estas células hacia el exterior, en la base de los pelos de la hendidura.

El interior de la tibia posterior está ocupado por un saco de composición quitinosa (saco cuticular) desde 50% (género *Exaerete*) al 85% de su volumen. Una capa de epidermis (capa unicelular de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de grosor) cubre la pared interna de la tibia y por encima se observa la capa de lámina basal. Un sistema de redes traqueales recubre el saco cuticular y se conectan a un saco traqueal de gran extensión que se localiza hacia el margen anterior de la tibia. Su extensión no es fácil de precisar, sin embargo, parece que cubre todo el margen anterior del saco cuticular y se extiende hacia la musculatura. El saco traqueal se limita de la hemolinfa por una capa de tejido conectivo y en su interior es lamelado, semejante a tendidos en los tubos traqueales. Se observaron gran cantidad de células lipídicas de gran tamaño (50 a 100  $\mu\text{m}$  de

largo y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro) localizadas hacia la pared del margen anterior, detrás de la musculatura y rodeada por el saco traqueal (margen anterior) y también se asocian a la pared interna de la hendidura. En el interior de estas células ovaladas se encuentra siempre numerosas vacuolas esféricas y una gran cantidad de mitocondrias.

Existen surcos de diferentes profundidades en la superficie externa del saco cuticular y son producto de plegamientos de la pared del saco hacia el interior. Estos dobleces pueden ser tan profundos que forman cámaras de diferentes tamaños dentro del saco, aparentemente incrementan la superficie de adhesión de los líquidos recolectados y ayudan en su retención. No existe musculatura conectada al saco. La musculatura de la tibia presenta un patrón típico de las abejas y se aloja a lo largo del margen anterior. La disposición de los músculos no es diferente a la de los zánganos de abejas mieleras (*Apis mellifera*).

Dentro del saco cuticular se observan proyecciones quitinosas que se extienden desde la pared interna hacia el centro del lumen. Estas proyecciones son ramificadas, más densas y complejas en *Euglossa* y menos en *Exaerete*. El tamaño de las proyecciones está relacionado con el tamaño de las cámaras que se forman por plegamientos del saco y otras deformaciones asociados al punto de inserción del tubo cuticular.

El saco cuticular parece ser un sitio de almacenaje y mezcla de los compuestos recolectado que posteriormente son rociados sobre las hembras durante un vuelo estático de encuentro. Un mecanismo que propone Eltz y colaboradores (2003) para sacar la mezcla es a través de movimientos de los músculos. Sin embargo, el saco traqueal podría ser una mejor palanca para exprimir el saco cuticular. Este saco traqueal tiene una extensión mayor que el saco y se corruga entre los músculos. Esta reforzado con lamelas y

posiblemente pueda llenarse de aire y ejercer una presión mecánica sobre el saco cuticular para exprimirlo y así regular la salida de la mezcla.

**Palabras claves:** morfología comparada, tibia posterior, machos, Euglossini, fragancias, feromona.

**Artículo 2: Biología de una larva polinívora, *Allograpta micrura* (Diptera: Syrphidae), en flores de *Castilleja talamancensis* (Scrophulariaceae).**

*Allograpta micrura* Osten Sacken es una especie de mosca neotropical de amplia distribución, recolectada desde tierras intermedias hasta altas, cuya larva fue desconocida hasta el presente estudio. Las larvas de *A. micrura* fueron observadas alimentándose de polen de la planta endémica *Castilleja talamancensis*. El comportamiento de fitofagia en estadíos inmaduros dentro del género *Allograpta* es conocido hasta recientemente; fueron consideradas exclusivamente depredadoras hasta el descubrimiento de *A. centropogonis*, una especie minadora de hojas estudiada por Nishida y compañía. Adultos de moscas de la familia Syrphidae se alimentan de polen y néctar pero pocas larvas han sido observadas alimentándose de polen. Este es un reporte de un comportamiento novedoso dentro de la subfamilia Syrphinae cuyas larvas son principalmente depredadores.

El presente estudio fue realizado principalmente en Cerro de la Muerte, Cordillera de Talamanca. Las larvas fueron encontradas comiendo dentro de botones florales y flores, aunque fueron mas abundantes en botones cerrados. Los adultos también se alimentan en flores (polen y néctar) de *C. talamancensis*, además de flores de otras especies. Hembras grávidas fueron observadas ovipositando en las inflorescencias de *C. talamancensis*. Un solo huevo fue puesto a la vez pero hasta mas de cuatro huevos han sido encontrados en la misma inflorescencia. Los huevos blancos se tornan a un

color gris varios días antes de la eclosión. Se presenta la descripción de la larva del tercer estadio realizado por el Dr. Graham Rotheray.

Las larvas fueron encontradas individualmente dentro de estructuras florales o frutos y hasta más de tres larvas en la misma inflorescencia. Cualquiera de los tres estadios larvales ha sido encontrada en botones cerrados, botones abiertos o flores; pero mayor cantidad de larvas de mayor tamaño fueron encontradas dentro de estructuras maduras (flores). Larvas utilizan estructuras únicas, las puntas fuertemente esclerotizadas del labro y labio, para perforar la teca y también para tomar el polen hacia la boca. Ellas solo digieren parcialmente el polen y no dañan otras partes reproductivas de la flor durante el proceso de alimentación. A diferencia de afidófagas, estas larvas defecan varias veces antes de pupar, probablemente para deshacerse de los granos no digeridos acumulados en el tracto digestivo para poder seguir alimentándose. El período de pupa fue de 9 a 13 días en condición de laboratorio(20 °C). Ningún pupario ha sido encontrado en el campo.

Algunas especializaciones de *A. micrura*, aparentemente relacionadas a este nuevo hábito, son labio y labro puntiagudos y fuertemente esclerotizados que utilizan para perforar anteras, mandíbulas con proyecciones carnosas que ayudan a empujar las masas de polen hacia la boca, al igual que la forma triangular del labio. Una base carnosa de la proyección espiracular posterior en larvas de tercer estadio, parece facilitar la movilización para habitar dentro de espacios limitados como botones o flores, donde permanecen durante el día. Las estructuras florales parecen proteger las larvas contra el frío ya que larvas murieron cuando fueron expuestas a 4 grados Celsius fuera de las estructuras florales y no así las protegidas.

Ninguna larva de *A. micrura* fue encontradas en flores de otras especies en Cerro de la Muerte. Pero fue encontrada en *C. irazuensis* en el Parque Nacional Volcán Irazú. Sin embargo, la distribución de *A. micrura* no se

restringe a la presencia de *C. talamancensis* y *C. irazuensis*, ambas plantas endémicas de Costa Rica y se encuentran sobre 2600 m.s.n.m. Sin embargo, la especie de mosca ha sido encontrada desde el sur de los Estados Unidos hasta el trópico sudamericano y en Costa Rica ha sido colectado a partir de elevaciones medias (1200 m.s.n.m.). Las posibilidades de alimentar en polen en estas localidades todavía no ha sido explorada.

**Palabras claves:** Larva polinívora, mosca sírfida, interacción insecto-planta, comportamiento alimentario, Costa Rica.

Director de tesis: Dr. Paul Hanso Snortum.

Postgrado en Biología

## LISTA DE CUADROS (TABLES)

### Artículo 1

Cuadro 1. Cuadro comparativo de características morfológicas externas en las tibias posteriores de machos de abejas euglosinas..... 39

Cuadro 2. Cuadro comparativo de características morfológicas internas en las tibias posteriores de machos de abejas euglosinas..... 40

### Artículo 2

Table 1. Similarity of the mean measurements (length, width and high) of puparium between females (n=11) and males (n=7)..... 93

Table 2. Number of infested structures in three flowering categories and its percentage occupied by each instar larvae (n= 80)..... 93

Table 3. Mean lengths of larvae, corolla tubes and calyces for larva of different instars in closed buds (n= 41), open buds (n= 11) and flowers (n= 28)..... 94



## LISTA DE FIGURAS

### Artículo 1

Fig. 1. Esquema de la tibia posterior en machos euglosinos..... 46

Fig. 2. Pata trasera de machos euglosinas: A) *Euglossa sapphirina*, B) *Eufriesea surinamensis*, C) *Eulaema meriana* y D) *Exaerete frontalis* con flechas indicando la hendidura en el margen posterior del segmento tibial. Esquema de la tibia posterior mostrando la relación de las formas de la tibia y la longitud de la hendidura, dibujos no a escala..... 47

Fig. 3. A. Cutícula en forma de acordeón en la hendidura en *Exaerete frontalis*. B. Saco traqueal (amarillo) y red de traqueas (blanco) que recubre el saco cuticular de *Eulaema meriana*, vista desde superficie superior. C. Micrografía interior del saco traqueal. D. Corte transversal de células lipídicas localizadas entre cutícula externa de superficie superior, cerca de la hendidura y el saco cuticular, *Eulaema meriana*. E.. Micrografía de una célula lipídica que se encuentra cerca del saco traqueal en *Eulaema meriana* (aumento 5000X). F. Células lipídicas agrupadas entre saco cuticular y la cutícula de la tibia en *Euglossa sapphirina*. C = cutícula, m= músculo, mit = grupo de mitocondrias, n = núcleo celular, p = proyecciones planas dentro del tubo cuticular, SC = Saco cuticular, ST= saco traqueal, t = tráquea, V = vacuolas globulares..... 48

Fig. 4. A. Tubo cuticular de lumen circular en *Eufriesea surinamensis* cuyo extremo distal se observa pelos finos que nacen en su interior (flecha), las células gigantes sobre la cutícula por encima del tubo. B. Dos cámaras formadas por plegamiento de la pared del saco cuticular por encima del punto de inserción del tubo cuticular en *Eufriesea surinamensis*. C. Pared interna del margen posterior de la tibia posterior de macho *Eufriesea surinamensis*, segmento del tubo cuticular roto, las "células gigantes" con forma de espinas y

un punto de fusión (flecha blanca) del saco cuticular a la pared interna. D. Corte transversal de la pared cuticular de la hendidura en *Eulaema meriana*, con dos proyecciones quitinosas (Q) rodeadas por una capa celular. E. Corte transversal de la tibia posterior de *Euglossa championi*, a nivel de la depresión anterior, mostrando las “células gigantes” que se asocian a la pared interna de la hendidura . F. Orificio de entrada al tubo cuticular (círculo punteado) sobre la hendidura de la tibia posterior *Euglossa* sp., se removió los pelos de la pared. C= cutícula, DA = Depresión anterior, DP = Depresión posterior, f = puntos de fusión, m = músculos, n = núcleo, Q = proyección quitinosa, SC = saco cuticular, ST = saco traqueal..... 49

Fig. 5. A. Vista lateral de la tibia posterior, con un segmento del margen posterior removido de *Euglossa imperialis* mostrando las cámaras dentro del saco cuticular. B. Tamaño del saco cuticular dentro de la tibia en *Euglossa sapphirina*. C. Corte transversal de la tibia posterior de *Euglossa sapphirina* mostrando la porción ocupada por musculatura, saco traqueal y “células gigantes”. D. Doblez en saca cuticular (flecha blanca) de *Euglossa sapphirina*. E. Esquema de proyecciones cuticulares plumosas en *Euglossa*, perforaciones circulares de mayor diámetro en la cutícula acampanada del saco. Proyección izquierda presenta un corte longitudinal del segmento basal del eje y de la estructura acampanada, exponiendo el segmento de extensión dentro de la campana. F. Segmento basal del eje de una proyección plumosa fusionada con el saco cuticular invaginado (campana) cuyo espacio está relleno por un tejido celular. C = cutícula, CI = células lipídica, m = músculos, P = extensión del eje que se introduce en la campana y es rodeada por células esféricas..... 50

Fig. 6. A. Micrografía de corte transversal de la pared del saco cuticular, epidermis y segmento de traquea en *Euglossa imperialis* (9000 X). B. Fila de “células gigantes” en la hendidura de la tibia de *Euglossa sapphirina*. Líquido almacenado es retenido por las proyecciones plumosas dentro del saco cuticular. C. Células gigantes en la pared interna de la hendidura en corte

transversal de la tibia posterior en *Euglossa championi*. D. Tibia posterior con cutícula externa parcialmente removida mostrando el surco curvado hacia arriba. E. Dos cámaras principales (Cg= cámara grande, Cp= cámara pequeña) producto de plegamiento del saco cuticular en *Eufriesea surinamensis*. F. Proyecciones plumosas en *Eufriesea surinamensis*. C = cutícula, CG = “células gigantes”, Mit = mitocondrias, p = proyección cuticular, RER = retículo endoplasmático rugoso, SC = saco cuticular..... 51

Fig. 7. A. Micrografía del segmento basal de proyecciones plumosas sobre pared del saco cuticular en *Eufriesea surinamensis* y el segmento que se proyecta hacia el exterior de la cutícula (flecha). B. Proyecciones con segmento basal ondulada, el área circundante a la base de las proyecciones hundida y una protuberancia en la pared externa del saco que coincide con el eje de la proyección interna. C. Canales (flecha) en pared cuticular de la depresión anterior que comunica desde “células gigantes” con los pelos del exterior *Eufriesea surinamensis*. D. Estriaciones tapizadas con orificios pequeños en la pared de la depresión posterior en *Eufriesea surinamensis* y presencia de orificios (flechas) en la pared externa por debajo de los pelos plumosos. E. Vista ventral de la pared interna de la depresión posterior (brocha de pelos en pared externa) en donde no fueron encontradas “células gigantes” en la tibia posterior de *Eufriesea maxicana*. C = cutícula, Cl = células lipídicas, SC = saco cuticular..... 52

Fig. 8. A. Saco cuticular de *Eulaema meriana*. B. Cámara formada por convoluciones del saco cuticular, flecha mostrando base del tubo sobre la depresión anterior (DA) de *Eulaema meriana*. C.– D. Corte transversal de tibia posterior en *Eulaema cingulata*, a nivel del punto de inserción del tubo cuticular (C) y hacia el extremo distal. E. “Células gigantes” tapizando toda la pared interna de la hendidura. F. Cutícula porosa de la depresión anterior (flechas punteadas). G. Secreción orientada a través de la cutícula de la depresión anterior hacia el orificio que se abre por debajo del pelo acanalado. CG =

“Células gigantes”, DA = depresión anterior, DP = depresión posterior, SC =  
saco cuticular..... 53

Fig. 9.A. Saco cuticular y la pared de la hendidura deformada en *Exaerete frontalis*, flechas indicando surcos profundos. B. Magnitud del hundimiento de la depresión en un corte transversal de la tibia posterior de *Exaerete smaragdina*. C. Pared interna de la depresión posterior de cubierta por tejido celular. D. Saco cuticular con dos cámaras internas formadas por plegamiento (flecha); células en forma de placas (\*) rodeando el margen posterior de la tibia en un espécimen joven de *Exaerete dentata*. c = cutícula, ST = saco traqueal.  
..... 54

Fig.10. A-B. Corte longitudinal de la tibia posterior de *Exaerete smaragdina*, una sección del saco cuticular ausente mostrando las proyecciones en el interior. C. Proyecciones en forma de cinta dentro del lumen del saco cuticular en *Exaerete smaragdina*. D. Esquema de dos ramificaciones típicas dentro del saco cuticular de *Exaerete smaragdina*. E-F. Dos tipos de proyecciones dentro del saco cuticular de *Exaerete frontalis*. G. Corte transversal de la tibia posterior de *Exaerete dentata* con un doblez (flecha) en el margen posterior. H. Densidad de proyecciones en el interior del saco cuticular de *Exaerete dentata*. I. Esquema de una proyección típica y las ondulaciones de la cutícula alrededor de la base. m = músculo, T = tráquea..... 55

## **Artículo 2**

Fig. 1: Larva features of *Allograpta micrura* (Osten Sacken, 1877) A. Orange color pollen mass seem trough the yellowish integument of a third instar larva. B. A late third instar larva turning green prior to pupation, showing the protruding posterior respiratory process. C. Micrograph of the frontal view of the head, showing the antennomaxillary papillae (solid arrow) and the tips of the slightly protruding labium and labrum covered by a solid material (dotted arrow, saliva

residue?); scale line = 100  $\mu$ m. D. Micrograph of the lateral view of the larva, showing the curved up tip of the labrum and labium. E. Micrograph of the fused posterior espiracular process. Arrow with dotted line shows the fleshy base and the arrow with solid line indicates the sclerotized spiracular plate. F. Head skeleton, scale line = 0.7mm; upper fig, lateral view, apex to the right; lower fig, ventral view, apex to the right. a = apodeme supporting labrum; dc = dorsal cornu; fl = fleshy lobe encasing mandible; lb = labium; lr = labrum; m = mandible; sa = sclerotised area; t = tentorial arm; vb = ventral bridge (sclerotised strip joining tentorial arms); vc = ventral cornu..... 86

Fig. 2: A. Recently formed puparium. The heart tube surrounded by white fat cells is visible in the dorsal portion. B. One end of the egg showing the scale-like pattern on the surface, the ridge-like structure (solid arrows) and the depression (micropyle?, dotted arrow). C. Two holes (arrows) made by larva in a young flower bud of *C. talamancensis*. D. Total reproductive structures and the number infested by larvae from 69 racemes of *C. talamancensis*..... 88

Fig. 3: Length of larvae in three instars of *Allograpta micrura* (Osten Sacken, 1877)..... 89

Fig. 4: Relation between the length of the larva and the length of the corolla in different floral structures (Adjusted  $r^2 = 0.36$ ,  $n = 80$ ,  $p < 0.0001$ )..... 90

Fig. 5: Relation between the length of the larva and the calyx length in different floral structures (Adjusted  $r^2 = 0.30$ ,  $n = 80$ ,  $p < 0.0001$ )..... 90

Fig. 6: Diagram of feeding process in larva of *Allograpta micrura* Osten Sacken, 1877 (motion of head skeleton indicated by white arrows). A and B: Pressing mouth parts against the theca and both tips of labrum and labium are protruding against the surface. C: Labium and labrum penetrate the theca and further extrusion of the head skeleton was accompanied by flexion of the labium

(tip of labium moving away from the labrum), by ventral rotation of the labrum at its apodemes ( black arrow). D: Head skeleton is lifted dorsally and retracted slightly. E: Larva changes angle of head projection and extends the thorax toward the pollen mass, tip of labium moves away from labrum and fill the cavity with pollen. F: Tip of labium moves back to labrum (black arrow) and push the pollen pellet into the mouth as the head skeleton retracts. P = prothorax, M = mesothorax, a = anterior spiracle, b = antennomaxillary papillae..... 91

Fig. 7: A – B. Pollen of *C. talamancensis* dyed blue with lactophenol. A. From anther of a fresh flower. B. From fresh frass showing a reduced density of dyed material in cytoplasm and rupture of the pollen wall after passing through the gut. (400 X magnification). C. Hole chewed in puparium by a parasitoid wasp *Paracaratomus* sp. D. Adult feeding on a flower of *C. talamancensis* by extending its proboscis into the corolla tube..... 92

## LISTA DE ABREVIATURAS

C = cutícula,

CG = “células gigantes”

Cg = cámara grande

Cl = células lipídicas

cm = centímetro

Cp = cámara pequeña

DA = depresión anterior

DP = depresión posterior

*Ef.* = *Eufriesea*

*Eg.* = *Euglossa*

*El.* = *Eulaema*

*Ex.* = *Exaerete*

f = puntos de fusión

m = músculo

mit = mitocondrias

mm = milímetro

n = núcleo

P = extensión del eje de proyecciones del saco cuticular en *Euglossa*

p = proyección cuticular

Q = proyección quitinosa asociada a “células gigantes”

RER = retículo endoplasmático rugoso

SC = saco cuticular

ST = saco traqueal

T = tráquea.

µm = micra = micrómetro

V = vacuolas globulares.

**ARTÍCULO 1. MORFOLOGÍA COMPARATIVA DE LAS TIBIAS POSTERIORES MODIFICADAS DE LOS MACHOS EN CUATRO GÉNEROS DE ABEJAS EUGLOSINAS (APINAE: EUGLOSSINI).**

Formato sugerido por la revista "Journal of Morphology"



## **Morfología comparativa de las tibias posteriores modificadas de los machos en cuatro géneros de abejas euglosinas (Apinae: Euglossini)**

**Ju Lin Weng**

*Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.*

**RESUMEN** Machos de las abejas euglosinas son los únicos insectos conocidos que poseen la capacidad de almacenar compuestos exógenos (i.e., terpenos, sesquiterpenos, alcoholes, indoles) dentro de sus tibias traseras. Estos compuestos son recolectados e introducidos dentro de un saco cuticular ubicado dentro de las tibias posteriores. No es clara la función de los compuestos recolectados pero la hipótesis más popular propone que la mezcla de los compuestos es procesada y utilizada en la atracción y cortejo de las hembras. Se realizó un estudio comparativo de la morfología interna y externa de la tibia posterior de cuatro géneros de machos utilizando Microscopías de luz y electrónica. Las observaciones muestran un patrón general en cuanto a modificaciones del segmento tibia: 1- presencia de una hendidura cubierto por pelos en el margen posterior de la tibia con un orificio localizado cerca del extremo basal de la hendidura, 2- "células gigantes" asociadas a la pared interna de la hendidura y 3- un saco cuticular compartimentada con proyecciones en la pared interna. Variaciones en forma, tamaño y densidad de las estructuras involucradas en este patrón general permiten distinguir a cada género. El tamaño de la hendidura y la densidad de pelos que la recubre son menores en *Euglossa*. La depresión cuticular de la hendidura es más intensa en *Exaerete* y la pared se corruga. El saco cuticular abarca desde 50% a 85% del volumen interno de la tibia según género. Las "células gigantes" son células glandulares clase 3 cuyos productos son conducidos por canalículos hacia la base de los pelos en el exterior de la hendidura. Hay células lipídicas de gran tamaño dentro de la cavidad tibial y contienen gran cantidad de vacuolas

esféricas y mitocondrias. Un saco traqueal recubre el margen anterior del saco cuticular y se conecta con una red de traqueas que cubre el restante del saco cuticular. Parece que el saco puede regular su volumen para oprimir el saco cuticular y facilitar salida de los compuestos almacenados.

**PALABRAS CLAVE:** morfología comparada, tibia posterior, machos, Euglossini, fragancias, feromona.

## INTRODUCCIÓN

Machos de las abejas euglosinas son los únicos insectos conocidos que almacenan compuestos exógenos dentro de sus tibias traseras (Dodson 1966; Dressler 1982; Roubik 1989). Estos compuestos incluyen terpenos, sesquiterpenos, terpenoides, alcoholes, indoles y otros compuestos aromáticos de cadenas pequeñas de carbón. Los machos euglosinos los recolectan en flores, exudados de troncos y raíces, madera en descomposición, hongos, excrementos y hasta emulsiones de DDT (Dodson 1966; Dodson et al. 1969; Dressler 1982; Roberts et al. 1982; Williams y Whitten 1983; Gerlach y Schill 1991; Whitten et al. 1993). Estos compuestos son recolectados por las patas anteriores y llevados inmediatamente hasta las patas traseras e introducidos dentro de un saco cuticular ubicado dentro de las tibias traseras (Dodson 1966; Dressler 1967). El proceso de recolecta es facilitado por secreciones lipídicas provenientes de las glándulas labiales (Whitten et al. 1989). Aparentemente, estas secreciones bucales también ayudan en disminuir la volatilidad de los compuestos recolectados y permite su almacenamiento por más de 15 días, sin sufrir modificaciones cualitativas o cuantitativas, dentro del saco cuticular (Eltz et al. 1999). Es muy posible que estos machos pasen gran parte de sus vidas, hasta varios meses, localizando fuentes de estas fragancias ya que muchas de ellas (i.e., flores de las orquídeas) poseen sólo trazos de pocos compuestos de interés (Ackerman 1983, a, b; Gerlach y Schill 1991). Se ha encontrado que la mezcla dentro del saco cuticular es especie específica y al parecer se vuelve

más compleja con el aumento de la edad del macho (Williams y Whitten 1983; Eltz et al. 1999).

No es clara todavía la función de los compuestos recolectados por los machos euglosinos. Existen varias hipótesis al respecto. La más popular es que la mezcla de los compuestos fragantes es modificada y utilizada en la atracción y cortejo de las hembras (Dodson et al. 1969; Dressler 1982). Esta idea surgió a raíz de la asimetría del comportamiento ya que sólo los machos recolectan las fragancias (Dodson 1966; Dressler 1982). Se especula que los compuestos almacenados en las tibias son precursores o componentes de la feromona sexual. Williams y Whitten (1983) propusieron que estos compuestos sufren reordenamientos biosintéticos dentro de la tibia posterior y son secuestrados vía hemolinfa hasta ser depositados en las glándulas mandibulares, de donde son expuestos como feromona sexual o territorial. A pesar de que Williams y Whitten (1983) encontraron cierta correspondencia en la composición de los compuestos dentro de la tibia trasera con extractos de la cabeza, no hay pruebas del traslado interno de estos compuestos; algunos son tóxicos por su naturaleza bioquímica (Roberts et al. 1982). Aunque la vía de traslado interno no ha sido de mucha aceptación, es un hecho que los machos se exponen a estos compuestos, y los almacenan a largo plazo dentro de las tibias. Así los machos tienen que sortear obstáculos en la búsqueda de los compuestos y en tolerar su toxicidad durante su almacenaje. La mezcla de los compuestos podría representar un criterio arbitrario para las hembras en cuanto a la calidad de los genes del macho, siendo aquel que posea una mezcla de mayor complejidad más atractivo para las hembras ("genes atractivos", Eberhard 1996) ya que es una buena cualidad heredable a sus hijos machos. De igual forma, una prolongada exposición a estos compuestos podría constituir una señal honesta de la capacidad fisiológica (i.e., tolerancia a los compuestos exógenos, capacidad de vuelo, termorregulación) otorgando un criterio para escogencia de la hembra sugerido por la Teoría del "handicap" (Zahavi 1975; Hamilton y Zuk 1982, Roubik & Hanson 2004).

Otro planteamiento posterior de Dodson (1975) sugirió que estos compuestos son transportados hacia las glándulas cefálicas y son utilizados en la atracción de otros machos para formar congregaciones o “leks”. Ya que es conocido que machos himenópteros como algunas especies de *Bombus* (Kullenberg et al. 1970; Bergström et al. 1973) utilizan secreciones glandulares con ésteres, terpenos y alcoholes para atraer a otros machos. En estos casos, la complejidad de los compuestos utilizados no es comparable con las mezclas encontradas en las tibias de los machos euglosinos. Tampoco hay evidencia que apoye el transporte de los compuestos almacenados desde las tibias posteriores hasta la cabeza, pero sí permanecen por muchos días dentro del saco cuticular (Eltz et al. 1999). Existen algunas observaciones de campo que demuestran cierta atracción de machos de la misma especie hacia la mezcla guardada dentro de las tibias en especímenes recién muertos (Dressler 1967; Dodson 1975; Eberhard 1997; Roubik 1999; Peruquetti 2000). En estos casos parecen más actos de aprovechamiento de una mezcla que una congregación de machos en despliegue. Peruquetti (2000) observó una congregación de 50 a 80 machos de *Euglossa cordata* atraídos hacia un arbusto donde algunos machos aplicaron sustancias extraídas de sus tibias traseras y posteriormente llegaron hembras. Esta hipótesis del uso de los compuestos almacenados para formar “leks” tiene menor aceptación puesto que en la mayoría de las especies de euglosinos cuya biología se conoce, los machos no realizan agregaciones (Dodson 1966; Dodson et al. 1969; Kimsey 1980; Schemske y Lande 1984; Stern y Dudley 1991; Stern 1992).

Las estructuras involucradas en la recolecta y almacenamiento de fragancias (i.e., pelos modificados en los tarsos delanteros, cepillos en el basitarso medio, área afelpada en la tibia media y la tibia posterior ensanchada con un saco en su interior) han sido estudiadas desde décadas atrás para tratar de entender el comportamiento (Dodson y Frymire 1961; Cruz-Landim et al. 1965; Vogel 1966; Kimsey 1984; Eltz 1997). Sucesivos estudios realizados por

Vogel (1966), Sagakami (1964), Cruz-Landim y colaboradores (1965) y Eltz (1997) en especies de *Euglossa*, *Eulaema* y *Eufriesea*. Estos estudios realizados con microscopía de luz y electrónica permitieron aportar ideas con respecto al funcionamiento del saco cuticular dentro de las tibias posteriores. Sin embargo no hubo mucho consenso en cuanto si es una estructura glandular o si es meramente un sitio de almacenaje de los compuestos. En el presente estudio, he observado las tibias traseras de representantes de los tres géneros estudiados anteriormente y también del género parasítico *Exaerete* en forma comparativa con dos objetivos: describir su morfología externa e interna y utilizar la morfología para discutir ideas sobre posibles funciones del saco cuticular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudió nueve especies en cuatro géneros de machos euglosinos (*Euglossa imperialis*, *Euglossa sapphirina*, *Eufriesea surinamensis* y *Eufriesea mexicana*, *Eulaema meriana*, *Eulaema cingulata*, *Exaerete dentata*, *Exaerete frontalis* y *Exaerete smaragdina*). Se usará abreviaturas para los géneros sólo cuando se mencionan las especies con el fin de acortar el texto: *Ef.*= *Eufriesea*, *Eg.*= *Euglossa*, *El.*=*Eulaema*, *Ex.*=*Exaerete*. Las patas traseras fueron examinadas bajo el estereoscopio para describir la tibia posterior a nivel de género. Tibias traseras de los machos mencionados fueron procesadas para observar su morfología interna utilizando microscopía de luz y Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B). Observaciones citológicas fueron realizados en *Euglossa imperialis*, *Euglossa championi* y *Eulaema meriana* utilizando Microscopía de Alta Resolución (M.O.A.R.) y Microscopía Electrónica de Trasmisión (M.E.T.).

Los especímenes fueron atraídos utilizando cebos artificiales (1,8 Cineole, Salicilato de Metilo y Acetato de Bencilo), en diferentes localidades de

Costa Rica. Utilicé desde tres a diez individuos por especie. También incluí tres individuos de *Ex. dentata* que fueron criados a partir de celdas recolectadas en Península de Osa, Puntarenas. Estudios con Microscopía Electrónica fueron realizados con especímenes frescos. Las abejas vivas fueron sumergidas, entera o mayor parte de ella, dentro de un baño del fijador Karnovsky (Glutaraldehído al 2.5% y Paraformaldehído al 2% en amortiguador de fosfato de sodio al 0.1 M, pH 7.4). Se utilizó una tijera afilada para realizar cortes limpios con las tibias totalmente sumergidas dentro del fijador; las tibias fueron cortadas en rodajas horizontales o en mitades por un corte longitudinal y luego se cortaron transversalmente para disminuir el tamaño de las piezas en segmentos menores de 5 mm de alto. Los cortes fueron sumergidos dentro del mismo fijador Karnovsky por más de 24 horas, a una temperatura aproximada de 4-5 °C dentro de una hielera.

Las muestras para M.E.B. (Hitachi modelo S-2360 N) fueron post fijados con Tetraóxido de Osmio (1%) por dos horas, seguido por deshidratación gradual con alcohol etílico (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 95°, 100°, 100°) lavado de 15 a 20 minutos cada uno y fueron secados por sublimación por terbutanol en secador al vacío a temperatura de 2° C. Las muestras secas fueron cubiertas con 60 nm de oro-paladio en el cobertor iónico Giko modelo 1B-3. Las muestras para M.E.T. y M.O.A.R. fueron post fijados con Tetraóxido de Osmio al 1% por 2 horas y Acido Tánico 1% como fijador secundario por una hora. Se lavaron las muestras y secados en cambios graduados de alcohol etílico e intercambios de proporciones de alcohol etílico y óxido de propileno. Las muestras fueron incluidas en resina Spurr (dureza alta) y polimerizada en estufa a 50 °C.

La ultramicrotomía fue realizada en Reichert Ultracuts marca Leica con cuchillas de vidrio en cortes de 0,4 a 0,5 µm (para M.O.A.R.). Las láminas fueron teñidas con azul de toluidina y se les tomó fotografías con una cámara Sanyo VDC-2950 adaptada al microscopio (Olympus CH30). Se utilizó cuchillo de diamante para obtener láminas de 60 nm para M.E.T (Hitachi modelo H-

7000). Se utilizaron rejillas de 20 “mesh” y los cortes fueron teñidos con Acetato de Uranilo y Plomo.

## RESULTADOS

### *Morfología externa*

#### Descripción general

En las descripciones se utiliza la terminología propuesta por Michener (2000), la superficie pulida y convexa es la superior, la superficie opuesta (plana) se denomina como inferior y el margen basal es la que conecta con el fémur y la distal es la que se conecta con el basitarso (Fig. 1). Tres características que se compara entre los géneros son la forma de la tibia visto desde la superficie superior, las estructuras encontradas en la superficie superior e inferior y la hendidura en el margen posterior del segmento (Fig. 2).

**Forma.** La tibia posterior de machos euglosinos se ensancha hacia el margen posterior por lo que es ligeramente ovalada a trapecoide en un corte transversal. La superficie superior es convexa y la inferior es plana. El margen anterior es más ancho que el posterior y este último termina ligeramente en punta. El punto de articulación tibia – basitarso se localiza hacia el margen anterior de la tibia en los géneros *Euglossa*, *Eufriesea* y *Eulaema* (Fig. 2.A-C). En *Exaerete*, este punto se localiza más hacia el centro de la tibia (Fig. 2.D). El grado de ensanchamiento no es uniforme a lo largo del margen posterior de *Euglossa*, es más ancho hacia el margen distal por lo que tiene una forma triangular a romboide, vista desde la superficie superior de la tibia (Fig. 2.A). La forma del segmento es un óvalo largo en *Eufriesea*, *Eulaema* y *Exaerete*, aproximadamente dos veces más largo que ancho. El margen distal posterior en *Euglossa* y *Exaerete* es redondeado, fuertemente convexo en *Euglossa* y

más discreto en *Exaerete*. Mientras que en *Eufriesea* y *Eulaema* se encuentran dos espinas aplanadas y truncadas en la esquina distal del margen posterior, una se extiende desde la superficie superior y otra desde la inferior (Fig. 2, Cuadro 1).

**Superficies externas.** La superficie superior de las tibias traseras es lustrosa y convexa, con coloración metálica en los géneros *Euglossa* y *Exaerete*; oscura con reflejos metálicos en *Eufriesea* y opaca en *Eulaema* (Cuadro 1). Esta superficie presenta pilosidad variada entre los géneros, *Euglossa* es el género que presenta menor densidad de pelos y *Eufriesea* el de mayor densidad. La cutícula alrededor de la base de estos pelos se adelgaza y se hunde ligeramente formando una depresión circular, más acentuados en *Eufriesea* y *Euglossa*. La superficie inferior de la tibia es plana en los cuatro géneros y está cubierta principalmente por kairotriquias. Los kairotriquias son pelos modificados cuya base es redonda y el extremo distal es aplanado, tienen aspecto semejante a una espátula acanalada cuyo extremo distal es cuadrado y ligeramente cóncavo. Estos pelos forman un ángulo menor de 90 grados con respecto a la cutícula, con la punta dirigida hacia el margen distal de la tibia.

**Hendidura.** Todos los géneros poseen una franja alargada en el margen posterior de la tibia. Esta franja consiste en una depresión cuticular alargada o una hendidura de coloración opaca, se inicia cerca de la mitad de la tibia y se extiende hasta el extremo distal, excepto en *Euglossa* (Fig. 2, Cuadro 1) que inicia cerca a 1/4 de la tibia y termina a 3/4 del segmento. La hendidura está recubierta por pelos de diferentes tamaños y formas. En general se reconocen 4 tipos: planos alargados, redondos alargados, redondos largos - ramificados (diferentes longitudes) y redondos cortos - ramificados. La densidad y arreglos de pelos que recubren las hendiduras difieren entre géneros, siendo *Euglossa* de menor densidad. La magnitud de la depresión cuticular es más visible en



*Euglossa* pero realmente es más profunda en los otros géneros ya que sus hendiduras están más cubiertas por los pelos (Cuadro 1).

Es posible percibir dos zonas en la hendidura cuando recorre la cutícula de la pared externa de la hendidura con la punta de un alfiler. Esta pared en *Euglossa*, *Eulaema* y *Eufriesea* es lisa, excepto por una irregularidad o levantamiento leve en la porción anterior que divide la hendidura en dos segmentos: la depresión anterior (DA) y la depresión posterior (DP). El tamaño de este levantamiento es heterogéneo (menor a 0,2 mm de largo), y varía entre los géneros pero nunca llega a nivelarse con la cutícula alrededor de la hendidura. A diferencia de los otros géneros (Cuadro 1), la pared de la hendidura en *Exaerete* es corrugada longitudinalmente asemejando a un acordeón y este conjunto corrugado se deprime hacia el interior de la tibia. Hay un levantamiento que se percibe entre la DA y la DP que coincide con la topología encontrada en *Eufriesea* y *Eulaema*. Aparte de la posición y el grado de depresión, el tipo de pelos que recubre cada porción de la hendidura es distintivo entre especies; los pelos planos se localizan en la DA y los pelos redondos a ligeramente aplanados, ambos ramificados, se localizan en la DP.

### **Género *Euglossa***

La tibia trasera de *Eg. sapphirina* mide cerca de 4 mm de largo, 2,8 mm de ancho y 1 mm de grosor. La hendidura inicia a un tercio de la longitud del margen posterior y termina un poco más abajo del segundo tercio del margen. La hendidura está conformada por dos porciones de la depresión dividida por una franja levantada de alrededor de 0,2 mm de ancho. La DA tiene forma de medio óvalo (aproximadamente 0,2 mm de largo) que se sitúa diagonalmente con respecto a la DP que tiene forma elíptica (aproximadamente 1 mm de largo, 0,5 mm de ancho y hasta 100  $\mu$ m de profundidad, Fig. 2A).

En ambas especies, *Eg. imperiales* y *Eg. sapphirna*, la DA está cubierta por pelos planos largos que se colocan diagonalmente una al lado de la otra, formando hileras paralelas de pelos planos alrededor del margen ovalado de la depresión. Debajo de los pelos planos se encuentran hileras mas laxas de pelos largos no plumosos planos curvados en su eje longitudinal. Las hileras de pelos largos se dirigen hacia el margen posterior de la DA y alcanzan a cubrir hasta el margen anterior de la DP, formando una especie de cortina ligeramente convexa.

En la DP se encuentran principalmente pelos plumosos que se recuestan casi horizontalmente sobre la cutícula. Hay unas filas de pelos largos que nacen desde el margen anterior y se dirigen hacia el margen posterior, y llegan a recubrir casi todo el ancho de la DP. Otra fila de pelos plumosos de menor longitud se extiende hacia el margen anterior de la DP pero sólo llega a cubrir un tercio del ancho de la depresión. La densidad de pelos disminuye hacia el interior de la depresión y hacia el extremo distal de la DP. Un hoyo de aprox. 0.10 mm de diámetro está situado en el extremo basal-anterior de la DP y está cubierto por un mechón de pelos largos y plumosos que la recubre diagonalmente.

### **Género *Eufriesea***

La tibia trasera de *Ef. surinamensis* es dos veces mas larga que ancha (7,2 mm largo, 3,6 mm de ancho y 2.4 mm de grosor; Fig. 2 B). La hendidura tiene la forma de una bala con el ancho máximo de aproximadamente 1 mm y el largo de 3,3 mm. En ambas especies *Ef. surinamensis* y *Ef. mexicana*, la hendidura (hasta mas de 200  $\mu$ m de profundidad) inicia por debajo de la mitad de la tibia y alcanza el extremo distal del margen posterior de ella. Una franja de cutícula lisa y pulida (0,5 mm de ancho) se encuentra formando una especie de marco del margen anterior de la hendidura. La superficie de esta franja es inclinada con respecto a la superficie externa de la tibia formando una repisa

entre la superficie externa y la hendidura. Esta repisa también existe en el margen posterior de la hendidura, más angosta pero de mayor ángulo de inclinación. También se percibe un área de cutícula más pulida alrededor del extremo basal de la hendidura.

El largo de la DA es aproximadamente un tercio de la DP (menor de 1 mm) y se sitúa diagonal-anterior a la DP, sugerida por la topología del levantamiento cuticular que divide estos dos sectores de la hendidura. El margen basal y laterales de la DA está rodeada por hileras de pelos planos y por debajo de estos pelos planos se observan pelos largos ligeramente curvos, con un canal en el centro del pelo y el extremo distal punteada y plana, semejante a una cinta (700 – 800  $\mu\text{m}$ ). El conjunto de pelos se dirige hacia el margen basal de la DP como una especie de cortina convexa semejante a lo del género *Euglossa*.

En ambos márgenes laterales de la hendidura, seguido de las repisas pulidas se inicia una columna densa de pelos largos y ramificados que se extiende mas o menos perpendicular al borde, semejante a dos brochas cuyas puntas distales convergen hacia el centro de la depresión y se tocan. Sobre la cutícula de la depresión se encuentran pelos más cortos y plumosos que son tapados de la vista por estas brochas largas. Un hoyo redondeado es observado en el margen basal de la DP muy cerca del centro de la depresión y también es alcanzado a ser tapado por la cortina de pelos largos que se extiende desde el margen redondeado de la DA.

### **Género *Eulaema***

La tibia trasera de *El. meriana* es dos veces mas larga que ancha (10 mm largo, 4,5 mm de ancho y 2.7 mm de grosor; Fig. 2 C). La hendidura tiene forma de lanza punteada en el extremo basal, el ancho máximo es aproximadamente 1.4 mm y el largo de 5,9 mm. En ambas especies, la

hendidura inicia por encima de la mitad de la tibia y alcanza el extremo distal del margen posterior de ella. Las repisas de cutícula lisa y pulida también se encuentra en ambos márgenes anterior y posterior de la DP, semejante a *Eufriesea*.

El largo de la DA es aproximadamente un cuarto de la DP y se encuentra conectada por encima de la DP. El levantamiento cuticular es ligeramente diagonal con respecto a la DP. La DA está cubierta por hileras de pelos planos (con un ligero canal en el centro) que se colocan como tejas inclinadas uno al lado del otro y en conjunto se dirigen hacia el margen basal. Un orificio redondo es observado en el margen distal de la DA en el margen posterior la depresión, tapado por la cortina de pelos largos que se extiende desde el margen de la DA.

Similar a *Eufriesea*, en ambos francos de la hendidura se conforman las brochas de pelos largos y plumosos que se extienden más o menos perpendicular al borde. Estos mechones largos también convergen hacia el centro de la depresión. Sobre la cutícula hundida de la DP surgen pelos redondos y plumosos de aprox. 0.3 mm de largo que se proyectan desde la cutícula de la hendidura hacia el exterior. Sin embargo, estos pelos no están a la vista, ya que dos columnas o brochas de pelos que se proyectan desde ambos márgenes laterales de la DP forman una cortina sobre la depresión. La brocha del margen anterior es más corta que la brocha del margen posterior (0.5 mm de largo) y se traslapan.

### **Género *Exaerete***

La forma de la tibia trasera de *Ex. frontalis* es semejante a un triángulo rectángulo (7,6 mm largo, 2,9 mm de ancho y 1,6 mm de grosor; Fig. 2 D). La hendidura tiene forma de bastón, con el extremo basal más ancho conformando la DA (0,6 mm de largo) y la DP es recta y es alrededor de 4 veces más largo que la DA. La hendidura mide alrededor de 4,1 mm de largo y 0,7 mm de

ancho, incluyendo a la franja inclinada y muy pulida que se localiza sólo a lo largo del margen anterior de la hendidura.

La hendidura tiene forma de bastón, se inicia cerca de la mitad de la tibia y casi alcanza el extremo distal del margen posterior. La DA se encuentra conectada ligeramente diagonal a la DP y se percibe el levantamiento cuticular que entre las dos zonas. La distribución de los pelos en cada zona de la hendidura es semejante a los géneros anteriores. Dos hileras densas de pelos largos y plumosos también se encuentran en los márgenes anterior y posterior de la DP. Pelos plumosos y cortos se encuentran sobre la cutícula de la depresión interna que es corrugada hacia el interior de la tibia, formando pliegues horizontales que le da un aspecto de un acordeón (Fig. 3 A), hasta más de 700  $\mu\text{m}$  de profundidad en *Ex. frontalis*. La presencia de la repisa inclinada sólo se da en el margen anterior de la hendidura; mientras que en el margen posterior, la hendidura se topa con una superficie convexa. Un orificio redondeado se localiza por debajo del levantamiento en el margen anterior de la DP. La depresión posterior en *Ex. frontalis* y *Ex. smaragdina* alcanza el margen distal de la tibia pero no es así en *Ex. dentata*, en que se trunca la depresión pocos milímetros antes de alcanzar el borde distal.

### ***Morfología interna***

#### **Descripción general**

En este estudio me enfoqué principalmente en las estructuras asociados al saco cuticular ya que es el sitio donde se aloja los compuestos recolectados por los machos. Detalles comparativos de algunas características entre los géneros se presenta en el Cuadro 2. Otras estructuras, no propiamente del saco cuticular, encontradas dentro de la cavidad tibia fueron las “Células gigantes” que se asocian principalmente a la pared interna de la hendidura y la

presencia de un gran saco traqueal que se aloja entre la musculatura y el saco cuticular (Cuadro 2).

El saco cuticular es de composición quitinosa se encuentra en el interior de las tibias traseras y ocupa desde 50% al 85% de su volumen según el género (Cuadro 2). Este saco de color claro se aloja hacia el margen posterior de la tibia y está fusionado a un tubo que a su vez se conecta con la pared interna de la hendidura. Una capa epidérmica (capa unicelular de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de grosor) cubre la pared interna de la tibia que es recubierta por la lámina basal. Sobre la superficie superior del saco cuticular se observa un sistema de redes traqueales que la cubre en su totalidad (Fig. 3.B) y esta sujeto por un tejido conectivo al cual se asocian una gran cantidad de células lipídicas aplanadas. Esta red de traqueas se conecta con un saco traqueal de gran extensión que se localiza hacia el margen anterior de la tibia, entre la musculatura y el saco cuticular. Su extensión no es fácil de precisar, sin embargo, parece que cubre todo el margen anterior del saco cuticular y se extiende hacia la musculatura. El saco traqueal es cuticular y se limita de la hemolinfa por una capa de tejido conectivo. La pared interna del saco es irregular y se forma irregularidades lineales o lamelas, se observan como estructuras semejantes a tenidios en los tubos traqueales (Fig. 3.C y E). Numerosas traqueas se extienden a partir del saco traqueal y se ramifican a tubos de menor grosor de lumen.

Una capa celular, aparentemente epidérmica, recubre el saco cuticular, probablemente como una extensión de la epidermis desde la pared interna de la tibia. También se observaron células ovaladas y esféricas entre el saco cuticular y la capa epidérmica, sin embargo no se logró observar con detalle en los preparados para diferentes técnicas. Por lo tanto no se puede precisar el tipo de célula más que en algunas se encontraron también gran cantidad de vacuolas esféricas. Células de similar constitución pero de mayor tamaño (50 a 100  $\mu\text{m}$  de largo y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro) son las células lipídicas o lipohemocitos que se

localizan hacia la pared detrás de la musculatura y rodeada por el saco traqueal (margen anterior) y también se asocian a la pared interna de la hendidura. En el interior de estas células de forma ovalada y de mayor grosor que las encontradas sobre la red traqueal, se encuentra siempre numerosas vacuolas esféricas de tamaño uniforme casi siempre y ocupan casi todo el volumen celular (Fig. 3.D). Las mitocondrias son las organelas más abundantes dentro del citoplasma de estas células y se distinguen como bastones u óvalos en los cortes observados al M.E.T. (Fig. 3.E). Estas células se encuentran frecuentemente en grupos y sus membranas en contacto estrecho (Fig. 3.F).

El saco cuticular se conecta al exterior de la tibia únicamente a través de un tubo cuticular, de 0,3 a 0,5 mm de largo, que se invagina desde el orificio encontrado en la parte superior de la hendidura. Este orificio es ligeramente engrosado con respecto a la cutícula que la rodea y su borde es liso. El extremo basal del tubo es redondo y denso pero conforme se extiende hacia el extremo distal (hacia el saco cuticular) éste puede aplanarse y se deforma como en las especies de *Euglossa*. *Eulaema* posee un tubo cilíndrico pero se tuerce en su extremo distal formando un espirar internamente mientras que el tubo de *Exaerete* es corto y espiralado. El tubo cilíndrico se mantiene recto en *Eufriesea* y se fusiona con el saco cuticular en su extremo distal (Fig. 4.A). Proyecciones planas como cintas con poca o ninguna ramificación se encuentran en el interior del tubo. Guiándose por la orientación de estas proyecciones se entiende que nacen dentro del tubo y se extienden hacia ambos extremos, hacia la hendidura y hacia el interior del saco.

Hay surcos de diferentes profundidades se observan en la superficie externa del saco cuticular y son producto de plegamientos de la pared del saco hacia el interior. Estos dobleces pueden ser tan profundos que forman cámaras de diferentes tamaños dentro del saco (Fig. 4.B). Por lo general, tubos traqueales de mayor grosor se encuentran asociados a estos dobleces

profundos y existen traqueas de menor diámetro que se extienden hacia el interior de estos plegamientos.

El saco cuticular se sujeta a la pared de la tibia por el tubo cuticular y otros puntos de fijación en la pared interna en los géneros *Euglossa*, *Eufriesea*, *Eulaema*, que poseen sacos de mayor tamaño. Estos puntos de fijación se dan en 1- a menos de un milímetro por encima de la hendidura (Fig. 4.C) y 2- en el margen distal y sobre el proceso articular de la tibia. Los puntos de fijación consisten en una ligera fusión de la superficie externa del saco con la cutícula de la tibia. No hay modificaciones adicionales del saco o en la pared de la tibia en estos puntos de fijación.

En las paredes internas de la hendidura se presentan proyecciones ramificadas cubiertas por células de gran tamaño (Cuadro 2, Fig.4.C, "células gigantes"). Estas proyecciones se encuentran agrupadas y se presentan alrededor de la base del tubo cuticular o hasta cubrir toda la pared interna de la hendidura en caso de *Eulaema*. Las proyecciones ramificadas son de composición quitinosa semejante a la pared cuticular pero menos compacta (Fig. 4.D) y carecen de capas que sugieran similar proceso de formación. Estas extensiones se proyectan hacia el interior de la tibia con un alcance cerca de 50  $\mu\text{m}$ . Las células que rodean estas proyecciones tienen forma de columnas rectangulares en *Eulaema*, o amorfas como es más evidente en *Eufriesea*. La membrana de las células amorfas es muy difícil de seguir por lo que no es posible determinar su tamaño. Estas células que denomino como "células gigantes" por su tamaño en *Eulaema* (columnas de hasta mas de 100  $\mu\text{m}$  de alto), poseen numerosos núcleos que a veces se encuentran agregados (Fig. 4.E).

A simple vista se puede observar puntos oscuros distribuidos sobre toda la superficie externa de los sacos. La densidad de los puntos es mayor en *Euglossa* y menor en *Exaerete*. Estos puntos están asociados a la cantidad de



estructuras que se localizan en la pared interna del saco que se detalla posteriormente (Cuadro2). No existe musculatura conectada al saco. La musculatura de la tibia presenta un patrón típico de las abejas y se aloja a lo largo del margen anterior. La disposición de los músculos no es diferente a la de los zánganos de abejas mieleras (*Apis mellifera*, Snodgrass 1956).

### **Género *Euglossa***

El tubo cuticular se invagina desde la pared externa de la DP (Fig. 4.F) y mide aproximadamente 0,3 mm en *Eg. sapphirina* y ligeramente más largo en *Eg. imperialis*, en ambas especies este tubo se inclina formando un ángulo agudo con respecto a la cutícula de la DA. La porción basal del tubo es redondeada y la distal se aplana y la pared cuticular se adelgaza y se expande irregularmente hasta contactar con el saco cuticular y se fusiona con la pared del saco. La deformación del tubo le da una apariencia de dos tubos planos, sin embargo son dobleces muy estrechos que comparten un lumen longitudinal. El tubo desemboca en una cámara circular vacía (aprox. 1 mm) ubicada en la porción media del saco cuticular. Esta cámara vacía es parte de una serie de 3 cámaras ovoides que se localizan en el interior del saco, en línea recta a lo largo del saco (Fig. 5.A).

El saco cuticular es de color amarillo brillante y ocupa un volumen alrededor del 80% del segmento tibial y se ensancha para tomar la forma de la tibia (Fig. 5.A y B). El espacio restante de la cavidad tibial es ocupado principalmente por el esqueleto muscular, saco traqueal, traqueas con extensas ramificaciones de distinto grosor y agrupaciones de células lipídicas (Fig. 5.C). La superficie externa del saco cuticular es corrugada semejante a un cerebro humano y a simple vista está poblada por puntos de color café. Desde la superficie externa se percibe plegamientos o dobleces del saco (Fig. 5.D) de considerable profundidad que parecen formar al menos dos cámaras en el interior, por encima de la línea de inserción del tubo invaginado. El grosor de la

pared del saco es irregular (aprox. 10  $\mu\text{m}$ ) y está rodeado por una capa celular de alrededor de 20  $\mu\text{m}$ . La superficie del saco es irregular, con invaginaciones cónicas que se distribuyen homogéneamente.

El interior del saco está tapizado por estructuras de composición quitinosa que se proyectan generalmente perpendiculares a la pared y con la punta distal extendida hacia el interior del saco. Las puntas distales llegan a tocarse en las regiones estrechas del saco (Fig. 5.A). Estas proyecciones poseen un eje cilíndrico (10  $\mu\text{m}$  en diámetro) con ramificaciones por niveles, las ramificaciones se proyectan hacia los lados casi perpendicularmente al eje (Fig. 5.E). Las ramificaciones pueden dividir secundariamente y entrelazar con las ramificaciones de las proyecciones circundantes en su nivel correspondiente (Fig. 5.E). En la base del eje se encuentra un segmento de donde sale un grupo de proyecciones de extensión irregular, de los cuales pocos se enlazan con las proyecciones basales en los ejes vecinos, los que se encuentran libres se proyectan ligeramente hacia el interior del saco que le da un aspecto de una sombrilla invertida este conjunto de proyecciones. Un segmento corto y liso de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de largo se localiza por debajo de esta sombrilla invertida y se fusiona con la estructura basal en forma de campana (20 – 30  $\mu\text{m}$  de alto y 40  $\mu\text{m}$  en diámetro, Fig. 5.F). La estructura acampanada consiste en invaginación de la pared del saco cuticular y en cuyo centro cóncavo se localiza una extensión del eje de las proyecciones internas (cerca de 10  $\mu\text{m}$ ). Tanto el eje como el segmento de extensión son cilindros huecos pero aparentemente el lumen se cierra en el punto de fusión con el saco cuticular. Dentro del espacio acampanado del saco cuticular se encuentran un tejido celular con células esféricas (cerca de 20  $\mu\text{m}$  de diámetro) de naturaleza desconocida.

La distribución de las proyecciones plumosas es casi equidistal, aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  entre una estructura acampanada de otra, excepto en los dobleces o en el borde de la inserción del tubo cuticular donde es variable. El eje de la proyección posee numerosos orificios de diámetros diferentes que

se localizan principalmente en la base de las ramificaciones y en las mismas ramificaciones. Orificios de borde liso también fueron encontrados en la pared del saco cuticular distribuidos aleatoriamente (Fig. 5.E). La cutícula del saco está conformada por capas densas de quitina y no se observaron poros finos que la atraviesa (Fig. 6.A). Hay proyecciones quitinosas hacia el interior de la capa epidérmica (Fig. 6.A) y la citología es similar a la epidermis que recubre la pared interna de la tibia, con un alto número de mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso.

En la pared interna de la DA se encontraron proyecciones quitinosas rodeadas por “células gigantes”. El conjunto tiene forma de un collar en la pared interna de la hendidura (Fig. 6.B). Sin embargo, se pudo apreciar mejor en cortes para M.O.A.R. de la especie *Eg. championi* (Fig. 6.C) cuyas estructuras en forma de coliflor son de mayor tamaño y cobertura que en *Eg. imperialis* y *Eg. sapphirina*. En esta especie, las proyecciones quitinosas se dan a lo ancho de la hendidura y se ramifican finamente. Las “células gigantes” conforman la capa celular que rodea estas proyecciones y parecen que son extensión de la misma epidermis de la cutícula circundante. Esta estructura está próxima a traqueaciones y a células lipídicas pero no tiene contacto directo con el saco cuticular (Fig. 6.C).

### **Género *Eufriesea***

El tubo quitinoso (0.5 mm) de lumen redondeado se proyecta hacia el interior de la tibia con un ángulo agudo de inclinación y su extremo distal se fusiona con el saco cuticular (Fig. 4.A) sin sufrir deformación. En la pared superior del saco se observa un doblez curvo que se extiende hacia el centro del saco siguiendo la misma trayectoria del tubo (Fig. 6.D). El saco cuticular ocupa cerca del 80 % del volumen interno de la tibia, cuya pared mide 2-5  $\mu\text{m}$  de espesor y presenta hundimientos asociados a la base de las proyecciones internas. La pared del saco presenta plegamientos de diferentes profundidades

asociados al punto de inserción del tubo, desde 100  $\mu\text{m}$  hasta más de 500  $\mu\text{m}$  de profundidad. Tres cámaras se forman a partir de estos plegamientos, dos próximas al margen anterior (encima y debajo del punto de inserción del tubo) que son de menor tamaño (500  $\mu\text{m}$ ) y la cámara a lo largo del margen posterior posee un lumen casi dos veces mayor (Fig. 6.E).

Las proyecciones internas son ejes cilíndricos erectos (aprox. 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 1 mm de longitud) que terminan en punta, poseen ramificaciones largas semejantes a pelos que se proyectan hacia los lados que pueden llegar a medir 100  $\mu\text{m}$  o más de longitud (Fig.6.F). Estas ramificaciones (cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro) no se dividen secundariamente y no se entrelazan con otras. La porción basal del eje también posee un segmento liso seguido por un segmento más ramificado. El eje posee orificios de distintos tamaños y distribuidos al azar. El tamaño de las proyecciones se relacionan con el tamaño de las cámaras en donde se encuentran, más cortas (cerca de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro de la base y 200 - 500  $\mu\text{m}$  de longitud) en cámaras de menor tamaño. Las ramificaciones se dan a lo largo del eje de las proyecciones de menor longitud pero se vuelven escasas en las proyecciones más largas. Las proyecciones en la cámara mayor llegan a medir hasta un milímetro (cerca de 30  $\mu\text{m}$  del diámetro de la base) y muchas de ellas carecen de ramificaciones en el segmento medio y hasta la punta distal; pero siempre existe un segmento cerca de la base con gran número de ramificaciones formando una especie de sombrilla (Fig.7.A). Existen numerosos orificios sobre el eje de este segmento más plumoso. En la cámara por debajo del punto de inserción del tubo hay proyecciones cortas con la porción basal aplanada. Otras proyecciones modificadas se localizan en el extremo distal del saco o asociada a dobleces del saco cuticular, poseen la porción basal del eje torcida en ondulaciones grandes. el eje de la proyección no es cilíndrico pero acanalado. La pared del saco cuticular alrededor de este tipo de proyección no se invagina sino que es cóncavo (Fig.7.B). Hay una proyección corta (cerca de 10  $\mu\text{m}$ ) que parece ser extensión del eje de proyección a través de la pared del saco (Fig.7.A y B). Este

segmento está presente en todo tipo de proyecciones, no posee ramificaciones pero es ahuecado. La pared interna del saco cuticular es lisa y no presenta orificios y la externa está cubierta por puntos pequeños de poca profundidad (Fig.7.B).

Las células gigantes fueron observadas principalmente en la pared interna de la DA. En *Ef. surinamensis*, las proyecciones con “células gigantes” se encuentran rodeando el tubo cuticular y una franja delgada de éstas se extiende hacia el margen basal bordeando la hendidura. Las proyecciones quitinosas en la pared interna de la DA son de mayor tamaño (hasta 150  $\mu\text{m}$  de alto) y tienen canales que se conduce hacia el exterior de la cutícula, desembocando en la base de la superficie inferior de los pelos planos y canalulados (Fig. 7.C). En el centro de la pared interna de la DP no se observó “células gigantes” pero la cutícula es porosa y forma espacios alargados que se extienden longitudinalmente. La pared de estos espacios internos está tapizada por estriaciones longitudinales que poseen orificios circulares. Pequeños orificios (5  $\mu\text{m}$ ) se observan en la superficie exterior por debajo de los pelos redondos y ligeramente plumosos (Fig. 7.D). En esta misma pared en *Ef. mexicana* no se observó porosidad sino una cutícula muy densa (Fig. 7.E) y en la pared interna se encuentra una capa epidérmica (aprox. 10  $\mu\text{m}$  de espesor) y células lipídicas (Fig. 7.F).

### **Género *Eulaema***

El saco cuticular ocupa alrededor de 85% del volumen de la tibia (Fig.8.A). El tubo cuticular cilíndrico (10  $\mu\text{m}$  diámetro) se fusiona con la cutícula de la DA y se proyecta lateralmente, dándole una apariencia más alargada (ovalada) al orificio basal del tubo (Fig. 8.B). El extremo distal del tubo cuticular se fusiona con el saco cuticular y adquiere una apariencia de una elipse que se proyecta hacia el interior del saco. Se puede observar una parte del saco con forma tubular próximo al sitio de inserción del tubo cuticular, de cuya superficie

se proyectan pelos hacia el exterior de la cutícula de la DA. Estos pelos tienen la base redondeada y se aplanan con forme alcanzan la DA. Este doblez tubular se extiende casi horizontalmente hacia la pared superior del saco y forma una primera cámara de pared corrugada que se extiende hacia el margen posterior y se ubica por encima y debajo del tubo cuticular (Fig.8.B).

Un surco profundo a lo largo del saco cuticular se observa en su superficie superior e inferior y corresponden a un plegamiento del saco hacia el interior (Fig.8.A). Este plegamiento es profundo y los dobleces se topan en el centro del saco dividiéndolo en dos cámaras longitudinales no equitativas que se comunican entre sí (Fig.8.C). La pared de la cámara frente a la hendidura es sumamente corrugada formando involucros profundos sobre sí, especialmente en la pared que limita con la hendidura y con la otra cámara. La pared de la cámara más lejana a la hendidura posee menor ondulación y permite observar proyecciones erectas dentro del lumen. La cámara próxima a la hendidura disminuye de tamaño conforme se extiende hacia el extremo distal del saco (Fig.8.D) en donde se disuelve la formación de dos cámaras. Proyecciones plumosas dentro de esta cámara son de menor extensión pero mayor grosor, semejante a las relaciones que se da en *Eufriesea*. Un espacio circular carente de proyecciones plumosas de alrededor de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro conecta la primera cámara con la segunda.

Las proyecciones dentro del saco en *Eulaema* son principalmente cilíndricas, alargadas y erectas, pero se ondulan en su segmento basal cuando las cámaras donde se encuentran son de menor tamaño que ellas. En general consisten en un eje con ramificaciones cilíndricas a planas y no tienen conexión entre sí. La morfología de estas proyecciones es muy similar a las que se presentan en *Eufriesea*. La base donde se aloja el eje en ambos géneros es ligeramente cónica pero no en forma de campana como la de *Euglossa*. La porción basal del eje ( $\sim 10$  a  $30 \mu\text{m}$ ) esta libre de pelos, en general más larga en *Eufriesea* que en *Eulaema*. Los pelos cerca de la base permanecen

extendidos hacia los lados y conforme se aleja de la base son más largos y finos. Las proyecciones dentro de las convoluciones de las primeras cámaras son relativas al lumen y están más espaciadas.

Las proyecciones con “células gigantes” se observan tapizando la pared interna de la hendidura (Fig.8.E) y se extiende ligeramente fuera de los límites de la depresión cuticular. Estas células no son amorfas en *Eulaema* sino se apilan regularmente una al lado de otra como columnas. Se extiende densamente sobre la pared del margen posterior como una alfombra cuyo grosor puede ser llegar a medir cerca de 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 8.F). Las células lipídicas y traqueas son muy evidentes en el espacio entre estas “células gigantes” y la pared cuticular. La cutícula de la depresión es engrosada y porosa, presenta canalículos orientados longitudinalmente con un lumen de pocos micrómetros de diámetro (Fig.8.F). Orificios alrededor de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro se observan en la pared externa de la hendidura por debajo de los pelos planos de la depresión anterior (Fig.8.G).

### **Género *Exaerete***

El tubo cuticular se fusiona con la pared de la hendidura, se tuerce para formar un espiral y se contacta con el saco cuticular en su extremo distal. La pared de la DP en *Ex. frontalis* y *Ex. smaragdina* se corruga hacia el interior de la tibia formando una pila de discos (cúspides) que aumentan en profundidad (hasta más de 700  $\mu\text{m}$  de diámetro) conforme se aproxima al margen distal de la tibia (Fig.9.A-C). La invaginación es menos pronunciada en *Ex. dentata* cuya hendidura no se extiende hasta el extremo distal del margen posterior. La pared interna de la hendidura está tapizada por la epidermis (Fig.9.C) y las “células gigantes” se encuentran en la parte llana, entre las cúspides de la corrugación y parecen rellenar el espacio. La pared de la hendidura es de menor grosor en comparación a la de superficie superior de la tibia y presenta pequeños orificios o poros en ambos lados de la pared. Existen células lipídicas a lo largo del

margen posterior de la tibia. Aparentemente, estas células no están llenas de vacuolas en abejas de pocas horas de edad (Fig.9.D, espécimen fijado recién saliendo de la celda)

El saco cuticular es punteado en los extremos basal y distal y la porción media es más ancha. Un surco y un fuerte doblez longitudinal (hasta 500  $\mu\text{m}$ ) producen una serie de cámaras de diferentes tamaños en el interior del saco (Fig.9.A) que difieren ligeramente entre especies. El saco se localiza libre de otros puntos de fijación sobre la cutícula interior. La musculatura y el saco traqueal ocupan el resto del espacio interno del segmento tibial (Fig. 10.A-B).

Las proyecciones internas dentro del saco cuticular son en general planas y alargadas. En *Ex. frontalis* y *Ex. smaragdina* estas proyecciones parecen hojas de zacate, tienen un segmento basal en forma de lígula de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de largo seguido de una proyección semejante a una hoja lanceolada de 300 a 400  $\mu\text{m}$  de largo, 50  $\mu\text{m}$  en su ancho máximo y pocos micrómetros de espesor (Fig.10.C-F). Las ramificaciones se presentan como pelos cilíndricos que salen desde los bordes laterales de la estructura aplanada. *Ex. frontalis* posee proyecciones con abundante o poca ramificación en los bordes (Fig. E-F) mientras que *Ex. smaragdina* posee de mediana ramificación a ninguna (Fig. C-D), asemejando una cita o pasta “spaghetti” con extremo distal en punta (400  $\mu\text{m}$  de extensión). *Ex. dentata* posee proyecciones semi cilíndricas sin ramificaciones que se encuentran muy dispersos en la pared interna del saco cuticular (Fig. 10.G-I).

## DISCUSIÓN

La tibia posterior de los machos euglosinos es una cavidad ensanchada que alberga un saco cuticular, el cual abarca hasta un 85 % del volumen interno de esta estructura, restringiendo la musculatura hacia el margen anterior de la



tibia. Los resultados de este estudio muestran la existencia de un patrón general en las estructuras modificadas de la tibia entre los cuatro géneros examinados. Del exterior hacia el interior, estas modificaciones son: 1- una hendidura cuticular que se localiza en el margen posterior con un orificio localizado en la porción basal de la hendidura; 2- presencia de las “células gigantes” en la pared interna de la hendidura y 3- la pared de la cutícula se invagina y forma un tubo rígido que se extiende para formar un saco con proyecciones en su pared interior y dobleces que forman cámaras internas. A partir de este esquema común cada género presenta variaciones particulares. Una de ellas se da a nivel de la hendidura en donde la forma, el tamaño y la abundancia de pelos asociados son variados, razón por la cual recibe nombres distintos en trabajos sucesivos; Sakagami (1964) utilizó “kleinere Scheibe” (= disco pequeño) para la zona anterior y “Hauptfurche” (= hendidura principal) para la zona posterior en *Eulaema nigrita*, mientras que “Napf” (= sartén) y “große pfanne” (= olla grande) fueron utilizados por Vogel (1966) en *Eg. cordata* y Eltz (1998) en *Eg. tridentata* para denominar las dos zonas en la hendidura. A pesar de las diferencias, la hendidura utiliza el mismo mecanismo de conducción (capilaridad) para acarrear los compuestos hacia el interior del saco (Sakagami 1964, Dodson 1966, Vogel 1966, Eltz 1997). El saco cuticular también presenta variaciones en la abundancia, densidad y forma de las proyecciones internas. A pesar de estas variaciones estructurales el saco parece conservar la misma función de retener los compuestos recolectados.

La profundidad de las depresiones de la hendidura difiere entre los géneros, sin embargo, la distribución de los pelos es bastante uniforme, pelos largos y planos recubren el orificio del tubo de entrada (semejante a una cortina) y pelos plumosos en el resto de la hendidura. La disposición de los pelos permite que estos sirvan de guía y transporte para los líquidos recolectados, los cuales son conducidos contra gravedad hacia el orificio que se localiza en el extremo basal de la hendidura. Por ejemplo al aplicar algunas gotas de atrayentes artificiales (1,8 –Cineole y Acetato de Bencilo) en el

extremo distal de la hendidura de *Euglossa* spp, *El. meriana*, *Ef. surinamensis* y *Ex. smaragdina*, estas gotas desaparecieron inmediatamente por debajo de las hileras de pelos plumosos (obs. pers.). Los pelos se humedecieron conforme pasaron las gotas y la migración del líquido terminó en el extremo basal de la hendidura, donde observe un ligero levantamiento de la cortina de pelos planos y luego la cortina volvió a su posición original. El agua, en cambio, no fue transportada y se acumuló como gotas sobre los pelos y la cutícula. La cera natural de la cutícula repele el agua (Chapman 1998) por lo que es posible que los machos utilicen en los pelos de la hendidura estas características hidrofóbicas para seleccionar los líquidos que transportan hacia el interior del saco. Los pelos plumosos también sirven como filtros a las partículas de mayor tamaño, por lo que es frecuente observar partículas de celulosa, tierra y resina atrapadas entre éstos pelos en los especímenes frescos y de las colecciones. Este fenómeno es más sobresaliente en las especies de *Exaerete*, en las cuales es posible encontrar hasta pequeñas astillas de madera y rocas diminutas entre la cutícula corrugada y las brochas de pelos de la depresión posterior.

Las “células gigantes” parecen ser las responsables en la secreción de los hidrocarburos (i.e. ceras) que recubren los pelos en las hendiduras. Este tipo de células epidérmicas se encuentran en la región de la hendidura y posiblemente se extienden también sobre el tubo cuticular. Las investigaciones anteriores también observaron estas células asociadas a proyecciones quitinosas sobre la pared interna de la hendidura. Vogel (1966) y Eltz (1997) propusieron que el conjunto de estas células epiteliales conforman una de las tres glándulas (“Napfdruse”) asociadas al saco cuticular en *Euglossa*, sin embargo los canales deferentes desembocan en el borde lateral de la depresión anterior y no directamente en el reservorio. Cruz-Landim y colaboradores (1966) describieron el conjunto de estas células epiteliales (denominado como “zona 3”) como parte de la “glándula tibial” y que su tamaño es variable entre géneros. Sin embargo, Sakagami (1965) refutó la hipótesis de que estas células forman

parte de la glándula tibial y propuso que estas células en columna podrían estar relacionadas a las células tricógenas durante el desarrollo de los pelos planos fuera de la hendidura. Todas las células epidérmicas puede considerarse glandulares en el sentido de que secretan la cutícula y las enzimas responsables en su producción (Chapman 1998). Pero algunas adquieren una función adicional como parece ser el caso de estas “células gigantes” que consisten en células glandulares Clase 3 según la clasificación de Noirot y Qennedy (1974). Al parecer los productos de estas células son distribuidos hacia el exterior por medio de canalículos encontrados en las paredes por debajo de las células y también pueden ser conducidos más lejos mediante las estriaciones con poros dentro de la cutícula de la hendidura. Todos ellos desembocan en el exterior de la hendidura, justo en la base de los pelos.

El líquido recolectado es guardado en el interior del saco cuticular cuya entrada no posee una válvula que regule el paso, el tubo cuticular es rígido y tampoco posee musculatura asociada que permita cerrar el saco para evitar el escape de los compuestos almacenados. Al parecer, la cortina de pelos planos funciona como la única barrera que limita el escape de los compuestos que recolectan los machos euglosinos, siendo muchos de ellos altamente volátiles (Williams y Whitten 1983). Sin embargo, las proyecciones ramificadas que se encuentran en el interior y las cámaras internas formadas por plegamientos del saco parecen otorgarles también una mayor capacidad de retención. El líquido extraído de los sacos cuticulares al exprimir las tibias posteriores de varias especies de *Euglossa*, se evaporaron en pocos minutos cuando fueron expuestos sobre una superficie lisa como el vidrio. Sin embargo, estos líquidos pueden ser retenidos por mucho más tiempo cuando se exponen desde un saco cortado (obs. pers.) Eltz y colaboradores (1999) encontraron que las reservas pueden permanecer sin variar cualitativa o cuantitativamente su composición por más de 15 días dentro de abejas en cautiverio. Es posible que una serie de variables como la presencia de proyecciones internas del saco, la capa de pelos planos que recubren el orificio y la secreción de las glándulas labiales en

conjunto ayuden en retener los líquidos hasta por 25 años en algunos especímenes en las colecciones entomológicas.

Los tres géneros no parasíticos poseen un saco cuticular de mayor extensión y parece que maximizan la superficie expuesta a los compuestos aumentando el número de proyecciones plumosas (*Euglossa*) y formando varias cámaras más pequeñas y con mayor cantidad de dobleces (*Eufriesea* y *Eulaema*). En cambio, las especies de *Exaerete* presentan menor densidad de proyecciones internas y también de sus ramificaciones, que contrastan enormemente con las especies de *Euglossa*. Otros aspectos de las proyecciones que distinguen los machos de los géneros no parasíticos son que el eje de las proyecciones es mayormente cilíndrico y cerca de sus bases presentan un anillo tupido de ramificaciones mientras que en *Exaerete* éstas son aplanadas y no presenta el anillo de ramificaciones. Estas diferencias morfológicas pueden estar asociadas con el tipo de compuestos que recolecta cada grupo, según la capacidad de retención del saco o frecuencia de uso en cada especie. Sin embargo, las observaciones sobre recolecta de compuestos con atrayentes artificiales o en sustratos naturales (Dodson et al. 1969; Williams y Dodson 1972, Dressler 1982; Ackerman 1983 a,b; Williams y Whitten 1983; Gerlach y Schill 1991) no son suficientes para indicar una preferencia a nivel de género y tampoco se conoce el modo de uso de estos compuestos. Por ahora no es posible explicar las diferencias morfológicas del saco cuticular.

Las observaciones recientes de despliegue y cópula de abejas euglosinas presentan un escenario mas claro en cuanto al uso de los compuestos recolectados por los machos (Eltz 1997, Eltz et al. 2003). Eltz (2004) observó, en pocas ocasiones, que las hembras son atraídas hacia los machos en despliegue y los machos parecen rociar la mezcla de compuestos almacenados en las tibias sobre la hembra durante un vuelo estático. La cópula se llevó a cabo durante pocos minutos y aparentemente los machos no utiliza la mezcla durante el acoplamiento (Eltz et al. 2003). Estos mismos investigadores

apoyan lo propuesto por Vogel (1966) de que los machos almacenan temporalmente los compuestos para ser utilizados luego como un rociado durante el cortejo. Esta es una proposición más parsimoniosa comparada con las ideas del traslado de los compuestos por la hemolinfa y su reubicación en las glándulas cefálicas. La morfología del saco cuticular y de la tibia posterior no apoya la vía de secuestro por hemolinfa ya que sólo en el género *Euglossa* se ha encontrado orificios en la pared del saco cuticular, pero no hay evidencias que la mezcla almacenada pase a través de los orificios hacia la hemolinfa. Además, el líquido almacenado dentro del saco cuticular de *Euglossa* parece que se queda atrapado entre las ramificaciones y no llega a tocar la pared interna del saco. En general, el saco cuticular es una capa densa que no parece presentar micro fisuras que evidencien una salida. Por lo que el tubo cuticular podría ser la única vía de salida para los compuestos almacenados. La idea de que el saco cuticular funciona como sitio de mezcla y almacenamiento de fragancias toma fuerza. Eltz y colaboradores (2003) sugieren que los movimientos de cruce de patas medias con patas posteriores de lados opuestos ("leg-crossing") pueden causar una presión de los músculos tarsales sobre el saco cuticular, empujando los líquidos cerca de la salida, o sea "cargando el saco". Sin embargo, estos movimientos de cruce de patas se dan muchas veces durante los vuelos y al parecer no causan la salida de los compuestos almacenados. Posiblemente, estos movimientos de empuje estén siendo regulados o realizados por el saco traqueal y la red de traqueas que recubre el saco. Este saco traqueal tiene una extensión mayor que el saco y se corruga entre los músculos. Esta reforzado con lamelas y posiblemente pueda llenarse de aire y ejercer una presión mecánica sobre el saco cuticular para exprimirlo y así regular la salida de la mezcla.

Todavía es especulativo si los compuestos llegan a sufrir alguna modificación previa a la exposición durante el cortejo. La morfología del saco cuticular de los cuatro géneros estudiados discrepa con algunas de las descripciones dadas por otros autores. No se encontraron las estructuras

glándulas descritas por Vogel (1966) y Eltz (1997) sobre la entrada del saco cuticular, las cuales están asociadas al tubo cuticular pero se conectan directamente al saco cuticular. En su lugar se encontraron cámaras pequeñas producto de plegamientos del saco cuticular que poseen también variaciones en forma y tamaño de las proyecciones internas. Sobre estas cámaras se encontraron células epidérmicas de mayor tamaño. Los preparados no permitieron mayor estudio sobre la capa epidérmica que cubren estas cámaras por lo que no se puede aclarar su función. No es extraño que los investigadores previos les atribuyeran un carácter glandular a las modificaciones internas en las tibias de machos euglosinos. Existe una variedad en formas y complejidad, desde unicelulares hasta grupos de células que se conectan a un reservorio, todas ellas epidérmicas, que han sido catalogadas como glándulas entre los insectos (Noirot y Qennedy 1974, Percy-Cunningham y McDonald 1987). Las glándulas tarsales son bien conocidas entre las abejas (Cruz-Landim et al. 1998; Jarau et al. 2004), avispas (Quicke y Falco 1998) y hormigas (Billen 1984), aunque su función puede ser muy distinta inclusive entre sexos de la misma especie (i.e. *Bombus*, Bergman y Bergström 1997). Sin duda alguna, los conocimientos de la morfología sólo permiten especular el modo operativo de las estructuras encontradas dentro de la tibia posterior de los machos euglosinos. Siguiendo las especulaciones, es necesario obtener los detalles de los comportamientos de cortejo y cópula para poder confirmar el uso de los compuestos durante estas interacciones; para así entender el por qué de estos machos que recolectan hasta 50 tipos diferentes de compuestos y aparentemente los cargan durante un largo período de sus vidas.

Las características morfológicas internas y externas de las tibias posteriores de los machos euglosinos sirven para separar con los géneros utilizando algunas características como la forma de la hendidura (distingue principalmente a *Euglossa* y *Exaerete*), el tamaño relativo del saco cuticular (distingue a *Exaerete* del resto), o las proyecciones internas del saco (distingue claramente *Euglossa* y *Exaerete* pero no fácilmente a *Eulaema* y *Eufriesea*).

Algunas de las características más sobresalientes para distinguir los géneros han sido a nivel del saco cuticular ya que no sólo el tamaño relativo de éste sino que las estructuras internas muestran diferencias. Las proyecciones internas dentro del saco cuticular son mucho más abundantes y complejas en las especies de *Euglossa*, semejante a una esponja. Mientras que en *Ex. erefe dentata*, el saco está casi desprovisto de dobleces y proyecciones en su interior. *Eufriesea* y *Eulaema* comprenden los estados intermedios, cuyo saco cuticular es de gran tamaño y poseen proyecciones plumosas muy semejantes en forma. Esta relación taxonómica parece reflejarse mejor en la filogenia que proponen Oliveira y Michel-Salzat y compañía (Cameron 2004) utilizando tanto caracteres morfológicos como caracteres de ADN en sus análisis (ver Apéndice I). Cameron (2004) hace la reseña sobre la posibilidad de que *Euglossa* y *Exaerete* fuesen grupos hermanas como lo sugiere primeramente Kimsey (1982), lo cual es discordante con las características morfológicas encontradas en las tibias posteriores.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Maribel Vargas, Ethel Sánchez y Leonora Rodríguez por las enseñanzas y colaboración para la observación de las muestras al microscopio electrónico; al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica por la colaboración en el estudio. También les agradezco a William Eberhard y Paul Hanson por sus valiosos comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la investigación y en el manuscrito; a Mónica Springer y Charlotte Skove por las traducciones de literatura en idioma alemán; a Thomas Eltz, John Billen y Stefan Jarau por compartir los conocimientos sobre morfología de insectos. Esta investigación fue apoyada por el Fondo de Financiamiento de Investigación otorgada por la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

**LITERATURA CITADA**

- Ackerman, J.D. 1983a. Diversity and seasonality of male euglossine bees (Hymenoptera: Apidae) in central Panama. *Ecology* 64: 274-283.
- Ackerman, J.D. 1983b. Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction. *Biological Journal of Linnean Society* 20: 301-304.
- Bergman P. & G. Bergström. 1997. Scent marking, scent origin, and species specificity in male premating behavior of two Scandinavian bumblebees. *Journal of Chemical Ecology* 23:1235-1251.
- Bergström, G. , B. Kullenberg and S. Stallberg-Stenhagen. 1973. Studies on natural odoriferous compounds VII. Recognition of two forms of *Bombus locorum* L. (Hymenoptera: Apidae) by analysis of the volatile marking secretion from individual males. *Chemical Scripta* 4: 174-182.
- Billen, J.P.J. 1984. Morphology of the tibial gland in the ant *Crematogaster scutellaris*. *Naturwissenschaften* 71:324-325.
- Cameron, S.A. 2004. Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology* 49:377-404.
- Chapman, R.F. 1998. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press. Massachusset. 770 pp.
- Cruz-Landim C. Da., R.L.M. Silva De Moraes, H.C. Salles & R.D. Reginato. 1998. Note on glands present in Meliponinae (Hymenoptera: Apidae) bees legs. *Revista Brasileira de Zoologia* 15:159-165.



- Cruz-Landim, C. Da, Stort, A.C., da Costa Cruz, M.A. & E.W. Kitajima. 1965. Órgão tibial dos machos de Euglossini. Estado ao microscópio óptico e eletrônico. *Revista Brasileira de Biologia* 25:323-342.
- Dodson C.H. 1966. Ethology of some bees of the tribe Euglossini (Hymenopter:Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 39:607-629.
- Dodson, C.H. 1975. Coevolution of orchids and bees. Pp. 91-99. En: *Coevolution of Animals and Plants*, L. E. Gilbert & P.H. Raven (eds). University of Texas Press. 263 pp.
- Dodson C.H. & G.P. Frymire. 1961. Natural pollination of orchids. *Missouri Botanical Garden Bulletin* 9:133-152.
- Dodson, C.H., R.L. Dressler, H.G. Hills, R.M. Adams & N.H. Willaims. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164:1243-1249.
- Dressler, R.L. 1967. Why do euglossine bees visit orchid flowers? Atas do simpósio sobre a Biota Amazônica 6: 171-180.
- Dressler, R.L. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:373-394.
- Eberhard, W.G. 1996. *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice*. Princeton University Press. Princeton. 472 pp.
- Eberhard W.G. 1997. Grave-robbing by male *Eulaema seabrai* bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 70: 66.

- Eltz, T. 1997. Zur Duftstoffbiologie netropischer Prachtbienen (Apidae:Euglossini). Diplomarbeit am Lehrstuhl für tierökologie und Tripenbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Eltz, T., W.M. Whitten, D.W. Roubik & K.E. Linsenmair. 1999. Fragrance collection, storage and accumulation by individual male orchid bees. *Journal of Chemical Ecology* 25:157-176.
- Eltz, T., D.W. Roubik, W.M. Whitten. 2003. Fragrance, male display and mating behavior of *Euglossa hemichlora* – a flight cage experiment. *Physiological Entomology* 28:251-260.
- Hamilton W.D. & M. Zuk. 1982. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites?. *Science* 218: 384-387.
- Járau, S., M. Hrnčir, M. Ayasee, C. Schulz, W. Francke, R. Zucchi & F. Barth. 2004. A stingless bee (*Melipona seminigra*) marks food sources with pheromone from its claw retractor tendons. *Journal of Chemical Ecology* 30; 793-803.
- Gerlach, G. & Schill, R. 1991. Composition of orchid scents attracting euglossine bees. *Botanical Acta* 104: 379-391.
- Kato, M., D. Roubik & T. Inoue. 1992. Foraging behavior and concentration preference of male euglossine bees (Apidae:Hymenoptera). *Tropics* 1:259-261.
- Kimsey, L.S. 1979. An illustrated key to the genus *Exaerete* with descriptions of male genitalia and biology (Hymenoptera: Euglossini, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 52:735-746.

- Kimsey L.S. 1980. The behavior of male orchid bees (Apidae, Hymenoptera, Insecta) and the question of leks. *Animal Behavior* 28: 996-1004.
- Kimsey, L.S. 1982. Systematics of bees of the genus *Eufriesea* (Hymenoptera: Apidae). University of California Publication in Entomology Vol. 95. 125 pp.
- Kimsey, L.S. 1984. The behavior and structural aspects of grooming and related activities in euglossine bees (Hymenoptera). *Journal of Zoology* 204: 541-550.
- Kimsey, L.S. 1987. Genetic relationship within the Euglossini (Hymenoptera: Apidae). *Systematic Entomology* 12:63-72.
- Kullenberg, B., G. Bergström & S. Stallberg-Stenhagen. 1970. Volatile compounds of the cephalic marking secretion of male bumble bees. *Acta Chemica Scandinavica* 24: 1481-1483.
- Percy-Cunningham & J.A. McDonald. 1987. Biology and ultrastructure of sex pheromone - producing glands. Pp: 27-75. En: *Pheromone Biochemistry*. G.D. Prestwich & G.J. Blomquist (eds). Academic Press. London.
- Peruquetti, R.C. 2000. Function of fragrances collected by Euglossini males (Hymenoptera: Apidae). *Entomologia General* 25:33-37.
- Noirot, C. & A. Quennedy. 1974. Fine structures of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology* 19: 61-80.
- Quicke, D.L.J. & J.V. Falco. 1998. A putative pheromone-gland associated modification of the hind tibia in *Vipio moneilemae* (Hymenoptera: Braconidae: Braconinae). *Journal of Hymenopteran Research* 7: 118-121.

- Roberts, D. R., W.D. Alecrim, J.M. Heller, S.R. Ehrhardt, and J.R. Lima. 1982. Male *Eufriesea purpurata*, a DDT-collecting euglossine bee in Brazil. *Nature* 294: 62-63.
- Roubik, D.W. 1989. Ecology and Natural History of Tropical Bees. Smithsonian Tropical Research Institute. Cambridge University Press. Massachusetts. 514 pp.
- Roubik, D.W. 1999. Grave-robbing by male *Eulaema* (Hymenoptera, Apidae): Implications for euglossine biology. *Journal of the Kansas Entomological Society* 71:188-191.
- Roubik, D.W. & P.E. Hanson. 2004. Abejas de orquídeas de la América tropical: Biología y guía de campo. Instituto Nacional de Biodiversidad. Heredia. 370 pp.
- Sakagami, S.F. 1964. Über den Bau der männlichen Hinterschiene von *Eulaema nigrita* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae). *Zool. Anz.* 175:347-354.
- Schemske, D.W. & R. Lande. 1984. Fragrance collection and territorial display by male orchid bees. *Animal Behavior* 32:935-937.
- Stern, D.L. & R. Dudley. 1991. Wing buzzing by male orchid bees, *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 64:88-94.
- Stern, D.L. 1992. Male territoriality and alternative male behavior in the euglossine bee, *Eulaema meriana* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 64:421-37.

Vogel, S. 1966. Parfümsammelnde Bienen als Bestäuber von Orchidaceen and Gloxinia. Österr. Botan. Zeit. 113:302-361.

Whitten, W. M., A.M. Young & N.H. Williams. 1989. Function of glandular secretion in fragrance collection by male euglossine bees. Journal of Chemical Ecology 15:1285-1295.

Williams, N.H & C.H. Dodson. 1972. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. Evolution 26:84-95.

Zahavi, A. 1975. Male selection: A selection for a handicap. Journal of Theoretical Biology 53: 205-214.

**Cuadro 1.** Cuadro comparativo de características morfológicas externas en las tibias posteriores de machos de abejas euglosinas.

Características externas / Géneros	<i>Euglossa</i>	<i>Eufriesea</i>	<i>Eulaema</i>	<i>Exaerete</i>
Forma	Triangular romboide	Ovoide	Ovoide	Triangular alargado
Espina tibial	Ausente	Ausente	Presente	Presente
Color de cutícula en superficie superior	Metálico	Metálico a opaco	Opaco	Metálico
Pilosidad en la superficie superior	Poca	Mucha	Media	Poca
Depresión cuticular dividido en dos sectores	Si	Si	Si	Si
Depresión alcanza el margen distal	No	Si	Si	Si-No
Dos mechones en depresión posterior	No	Si	Si	Si
Profundidad de la depresión posterior	Leve	Media	Media	Intensa
Cutícula corrugada en depresión posterior	No	No	No	Si
Abundancia de pelos plumosos sobre depresión posterior	Leve	Media	Media	Mucha

**Cuadro 2.** Cuadro comparativo de características morfológicas internas en las tibias posteriores de machos de abejas euglosinas.

Características internas/ Géneros	<i>Euglossa</i>	<i>Eufriesea</i>	<i>Eulaema</i>	<i>Exaerete</i>
Número de perforaciones en depresión anterior	1	1	1	1
Volumen del saco de fragancias dentro de tibia	85%	80%	85%	50%
Cantidad de proyecciones dentro de saco	Mucha	Mucha a media	Media a mucha	Media a poca Plano a parcial
Forma de proyecciones	Cilíndrica	Cilíndrica	Cilíndrica	redondo*
Ramificación en proyecciones dentro del saco	Alta	Media	Media	Media a nada*
Conexión entre ramificaciones	Si	No	No	No
Levantamiento de la base de proyecciones	Intenso	Medio a leve	Medio a leve	Leve a nada
Orificios en proyecciones	Si	Si	Si	No
Huecos en cutícula del saco	Si	No	No	No
Cantidad de "células gigantes"	Poca	Media	Mucha	Mucha
Presencia del gran saco traquial	Si	Si	Si	Si

\* en *Exaerete dentata*

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 1.** Esquema de la tibia posterior en machos euglosinos.

**Fig. 2.** Pata trasera de machos euglosinas: A) *Euglossa sapphirina*, B) *Eufriesea surinamensis*, C) *Eulaema meriana* y D) *Exaerete frontalis* con flechas indicando la hendidura en el margen posterior del segmento tibial. Esquema de la tibia posterior mostrando la relación de las formas de la tibia y la longitud de la hendidura, dibujos no a escala.

**Fig. 3. A.** Cutícula en forma de acordeón en la hendidura en *Exaerete frontalis*. **B.** Saco traqueal (amarillo) y red de traqueas (blanco) que recubre el saco cuticular de *Eulaema meriana*, vista desde superficie superior. **C.** Micrografía interior del saco traqueal. **D.** Corte transversal de células lipídicas localizadas entre cutícula externa de superficie superior, cerca de la hendidura y el saco cuticular, *Eulaema meriana*. **E.** Micrografía de una célula lipídica que se encuentra cerca del saco traqueal en *Eulaema meriana* (aumento 5000X). **F.** Células lipídicas agrupadas entre saco cuticular y la cutícula de la tibia en *Euglossa sapphirina*. **C** = cutícula, **m**= músculo, **mit** = grupo de mitocondrias, **n** = núcleo celular, **p** = proyecciones planas dentro del tubo cuticular, **SC** = Saco cuticular, **ST**= saco traqueal, **t** = tráquea, **V** = vacuolas globulares.

**Fig. 4. A.** Tubo cuticular de lumen circular en *Eufriesea surinamensis* cuyo extremo distal se observa pelos finos que nacen en su interior (flecha), las células gigantes sobre la cutícula por encima del tubo. **B.** Dos cámaras formadas por plegamiento de la pared del saco cuticular por encima del punto de inserción del tubo cuticular en *Eufriesea surinamensis*. **C.** Pared interna del margen posterior de la tibia posterior de macho *Eufriesea surinamensis*, segmento del tubo cuticular roto, las "células gigantes" con forma de espinas y un punto de fusión (flecha blanca) del saco cuticular a la pared interna. **D.** Corte transversal de la pared cuticular de la hendidura en *Eulaema meriana*, con dos



proyecciones quitinosas (Q) rodeadas por una capa celular. **E.** Corte transversal de la tibia posterior de *Euglossa championi*, a nivel de la depresión anterior, mostrando las “células gigantes” que se asocian a la pared interna de la hendidura. **F.** Orificio de entrada al tubo cuticular (círculo punteado) sobre la hendidura de la tibia posterior *Euglossa* sp., se removió los pelos de la pared. **C**= cutícula, **DA** = Depresión anterior, **DP** = Depresión posterior, **f** = puntos de fusión, **m** = músculos, **n** = núcleo, **Q** = proyección quitinosa, **SC** = saco cuticular, **ST** = saco traqueal.

**Fig. 5. A.** Vista lateral de la tibia posterior, con un segmento del margen posterior removido de *Euglossa imperialis* mostrando las cámaras dentro del saco cuticular. **B.** Tamaño del saco cuticular dentro de la tibia en *Euglossa sapphirina*. **C.** Corte transversal de la tibia posterior de *Euglossa sapphirina* mostrando la porción ocupada por musculatura, saco traqueal y “células gigantes”. **D.** Doblez en saca cuticular (flecha blanca) de *Euglossa sapphirina*. **E.** Esquema de proyecciones cuticulares plumosas en *Euglossa*, perforaciones circulares de mayor diámetro en la cutícula acampanada del saco. Proyección izquierda presenta un corte longitudinal del segmento basal del eje y de la estructura acampanada, exponiendo el segmento de extensión dentro de la campana. **F.** Segmento basal del eje de una proyección plumosa fusionada con el saco cuticular invaginado (campana) cuyo espacio está relleno por un tejido celular. **C** = cutícula, **Cl** = células lipídica, **m** = músculos, **P** = extensión del eje que se introduce en la campana y es rodeada por células esféricas.

**Fig. 6. A.** Micrografía de corte transversal de la pared del saco cuticular, epidermis y segmento de traquea en *Euglossa imperialis* (9000 X). **B.** Fila de “células gigantes” en la hendidura de la tibia de *Euglossa sapphirina*. Líquido almacenado es retenido por las proyecciones plumosas dentro del saco cuticular. **C.** Células gigantes en la pared interna de la hendidura en corte transversal de la tibia posterior en *Euglossa championi*. **D.** Tibia posterior con cutícula externa parcialmente removida mostrando el surco curvado hacia

arriba. **E.** Dos cámaras principales (**Cg** = cámara grande, **Cp** = cámara pequeña) producto de plegamiento del saco cuticular en *Eufriesea surinamensis*. **F.** Proyecciones plumosas en *Eufriesea surinamensis*. **C** = cutícula, **CG** = “células gigantes”, **Mit** = mitocondrias, **p** = proyección cuticular, **RER** = retículo endoplasmático rugoso, **SC** = saco cuticular.

**Fig. 7. A.** Micrografía del segmento basal de proyecciones plumosas sobre pared del saco cuticular en *Eufriesea surinamensis* y el segmento que se proyecta hacia el exterior de la cutícula (flecha). **B.** Proyecciones con segmento basal ondulada, el área circundante a la base de las proyecciones hundida y una protuberancia en la pared externa del saco que coincide con el eje de la proyección interna. **C.** Canales (flecha) en pared cuticular de la depresión anterior que comunica desde “células gigantes” con los pelos del exterior *Eufriesea surinamensis*. **D.** Estriaciones tapizadas con orificios pequeños en la pared de la depresión posterior en *Eufriesea surinamensis* y presencia de orificios (flechas) en la pared externa por debajo de los pelos plumosos. **E.** Vista ventral de la pared interna de la depresión posterior (brocha de pelos en pared externa) en donde no fueron encontradas “células gigantes” en la tibia posterior de *Eufriesea maxicana*. **C** = cutícula, **CI** = células lipídicas, **SC** = saco cuticular.

**Fig. 8. A.** Saco cuticular de *Eulaema meriana*. **B.** Cámara formada por convulsiones del saco cuticular, flecha mostrando base del tubo sobre la depresión anterior (DA) de *Eulaema meriana*. **C.– D.** Corte transversal de tibia posterior en *Eulaema cingulata*, a nivel del punto de inserción del tubo cuticular (**C**) y hacia el extremo distal. **E.** “Células gigantes” tapizando toda la pared interna de la hendidura. **F.** Cutícula porosa de la depresión anterior (flechas punteadas). **G.** Secreción orientada a través de la cutícula de la depresión anterior hacia el orificio que se abre por debajo del pelo acanalado. **CG** = “Células gigantes”, **DA** = depresión anterior, **DP** = depresión posterior, **SC** = saco cuticular.

**Fig. 9. A.** Saco cuticular y la pared de la hendidura deformada en *Exaerete frontalis*, flechas indicando surcos profundos. **B.** Magnitud del hundimiento de la depresión en un corte transversal de la tibia posterior de *Exaerete smaragdina*. **C.** Pared interna de la depresión posterior de cubierta por tejido celular. **D.** Saco cuticular con dos cámaras internas formadas por plegamiento (flecha); células en forma de placas (\*) rodeando el margen posterior de la tibia en un espécimen joven de *Exaerete dentata*. **C** = cutícula, **ST** = saco traqueal.

**Fig. 10. A-B.** Corte longitudinal de la tibia posterior de *Exaerete smaragdina*, una sección del saco cuticular ausente mostrando las proyecciones en el interior. **C.** Proyecciones en forma de cinta dentro del lumen del saco cuticular en *Exaerete smaragdina*. **D.** Esquema de dos ramificaciones típicas dentro del saco cuticular de *Exaerete smaragdina*. **E-F.** Dos tipos de proyecciones dentro del saco cuticular de *Exaerete frontalis*. **G.** Corte transversal de la tibia posterior de *Exaerete dentata* con un doblez (flecha) en el margen posterior. **H.** Densidad de proyecciones en el interior del saco cuticular de *Exaerete dentata*. **I.** Esquema de una proyección típica y las ondulaciones de la cutícula alrededor de la base. **m** = músculo, **T** = tráquea.

**FIGURAS**

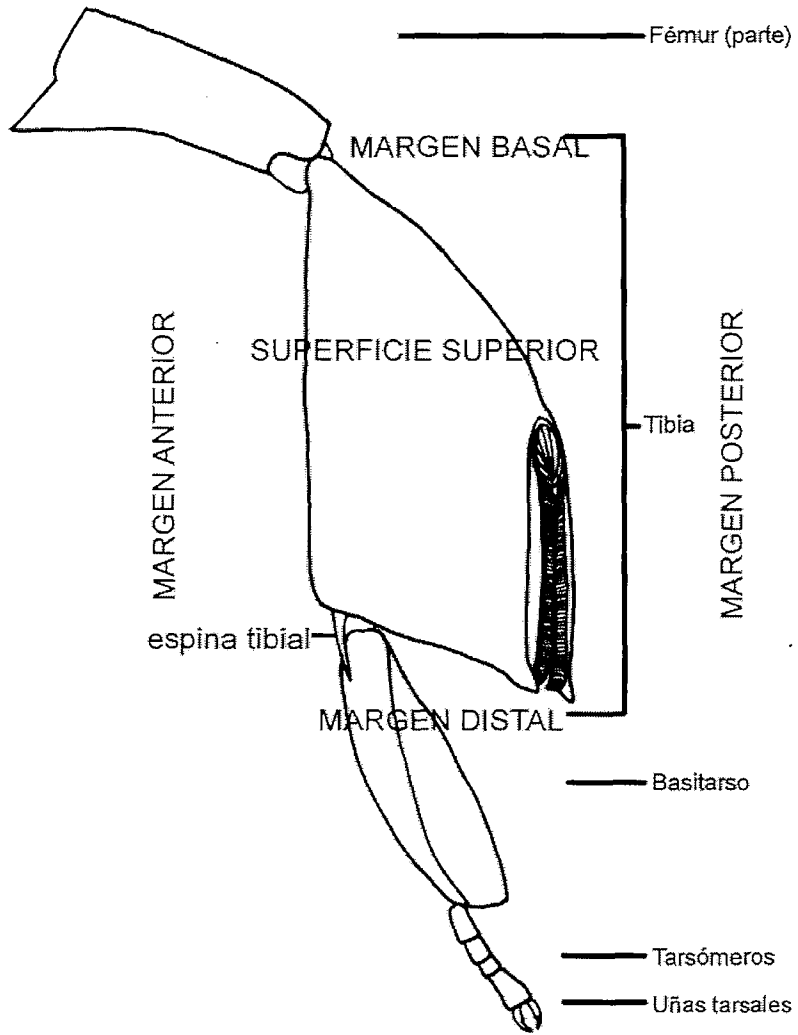


Figura 1.

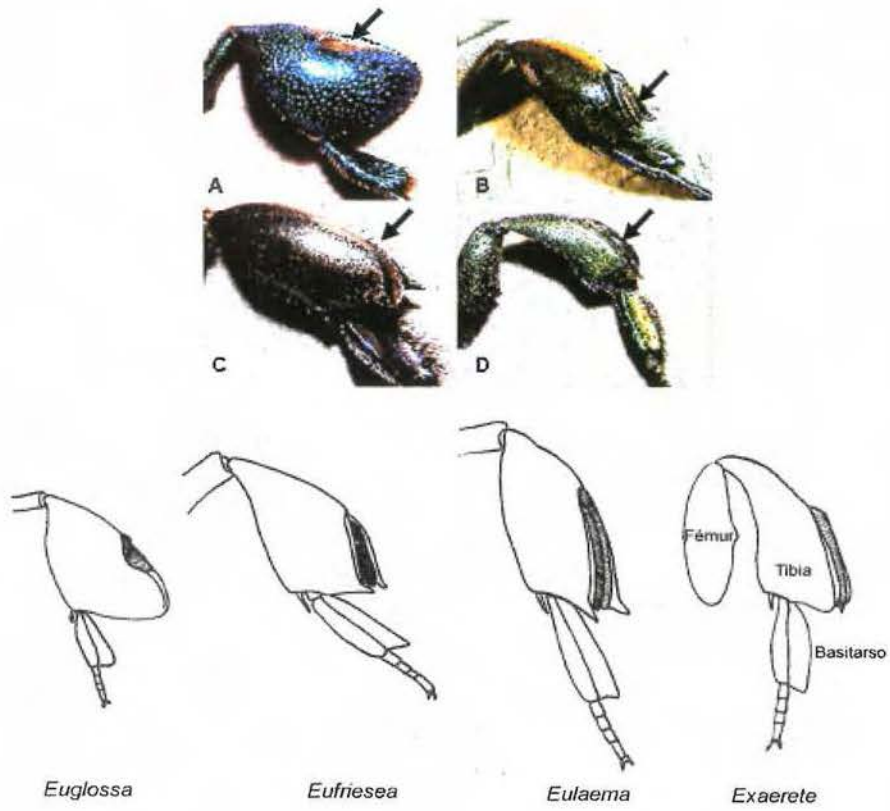


Figura 2.

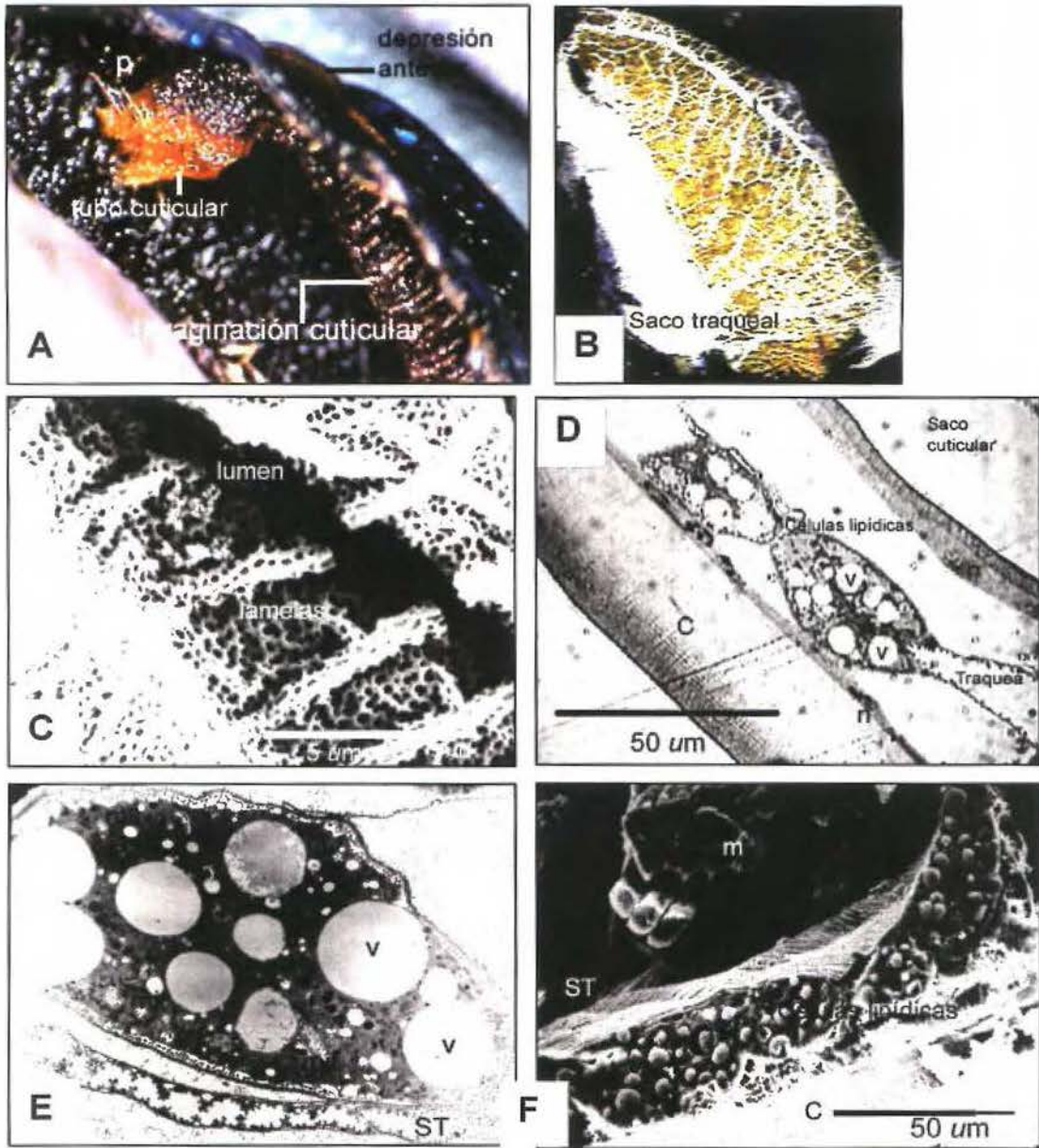


Figura 3.

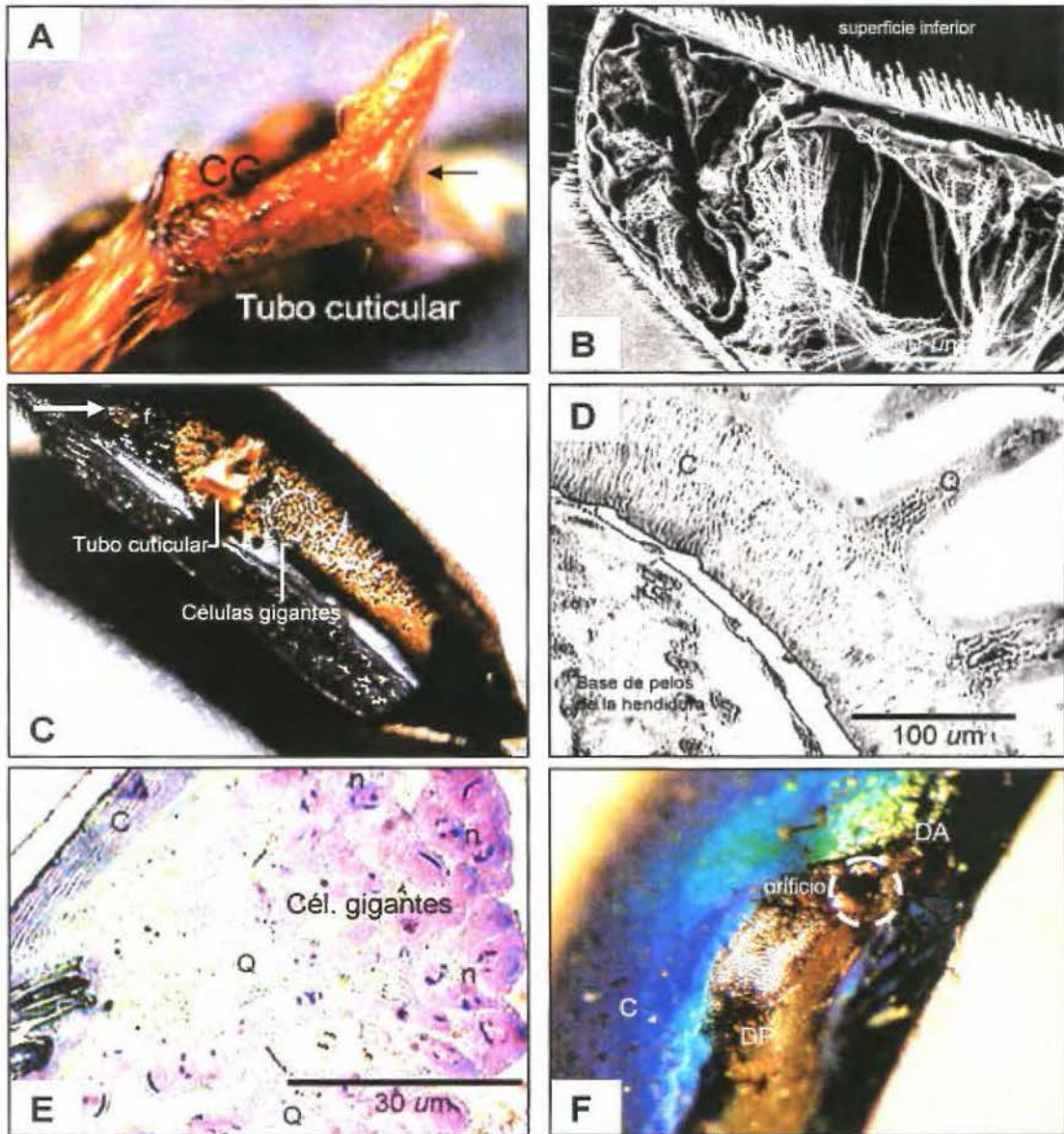


Figura 4.



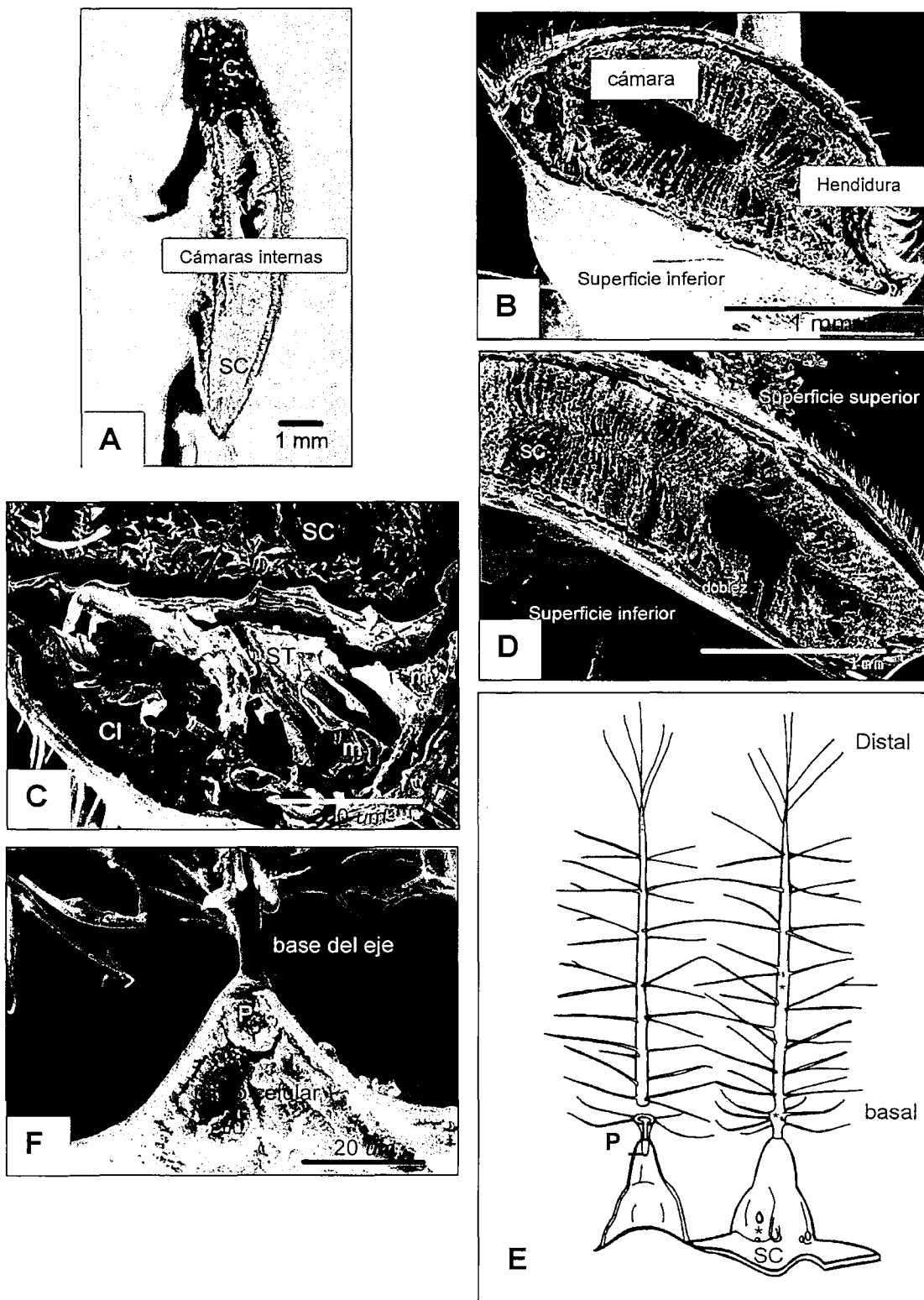


Figura 5.

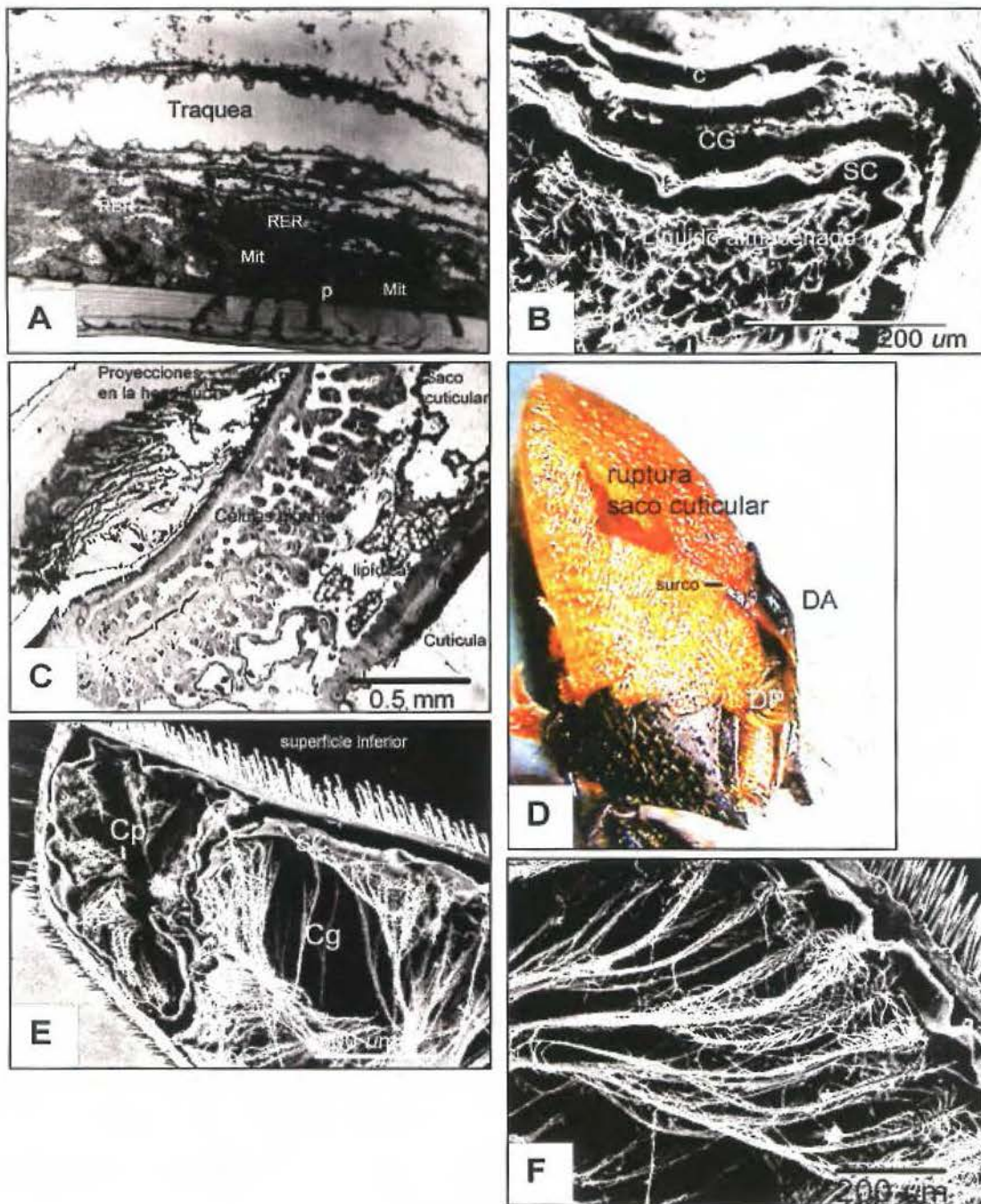


Figura 6

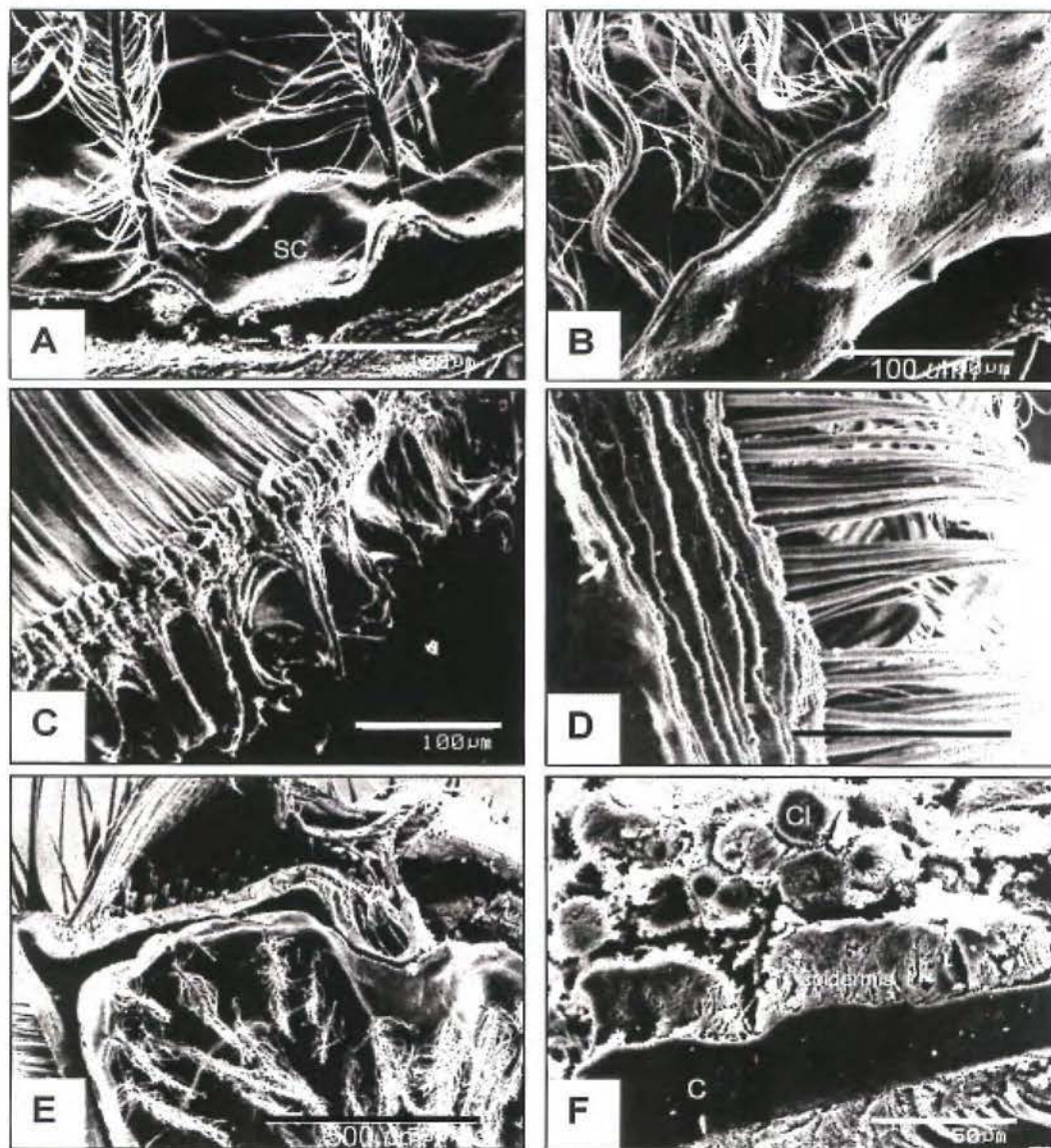


Figura 7.

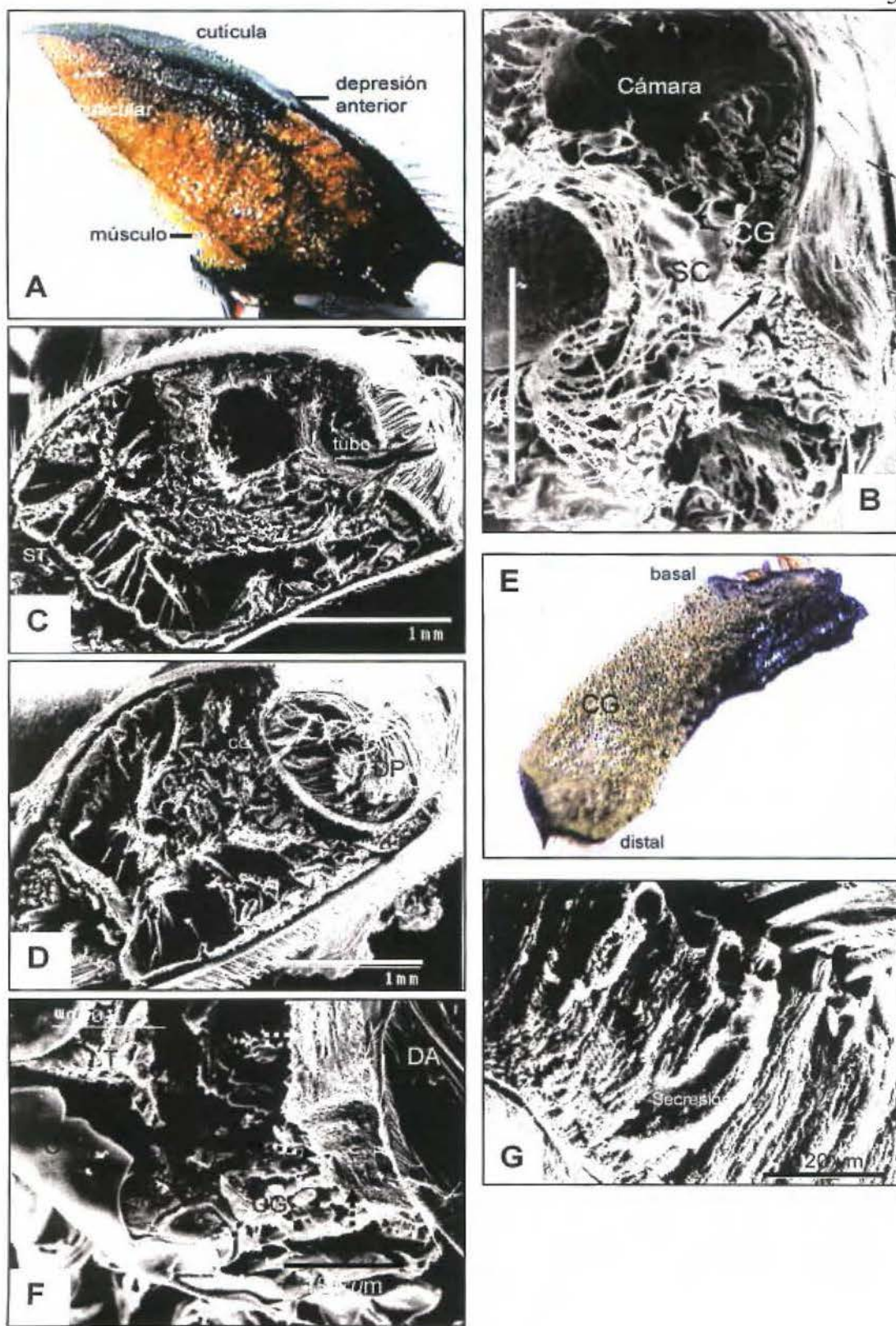


Figura 8.

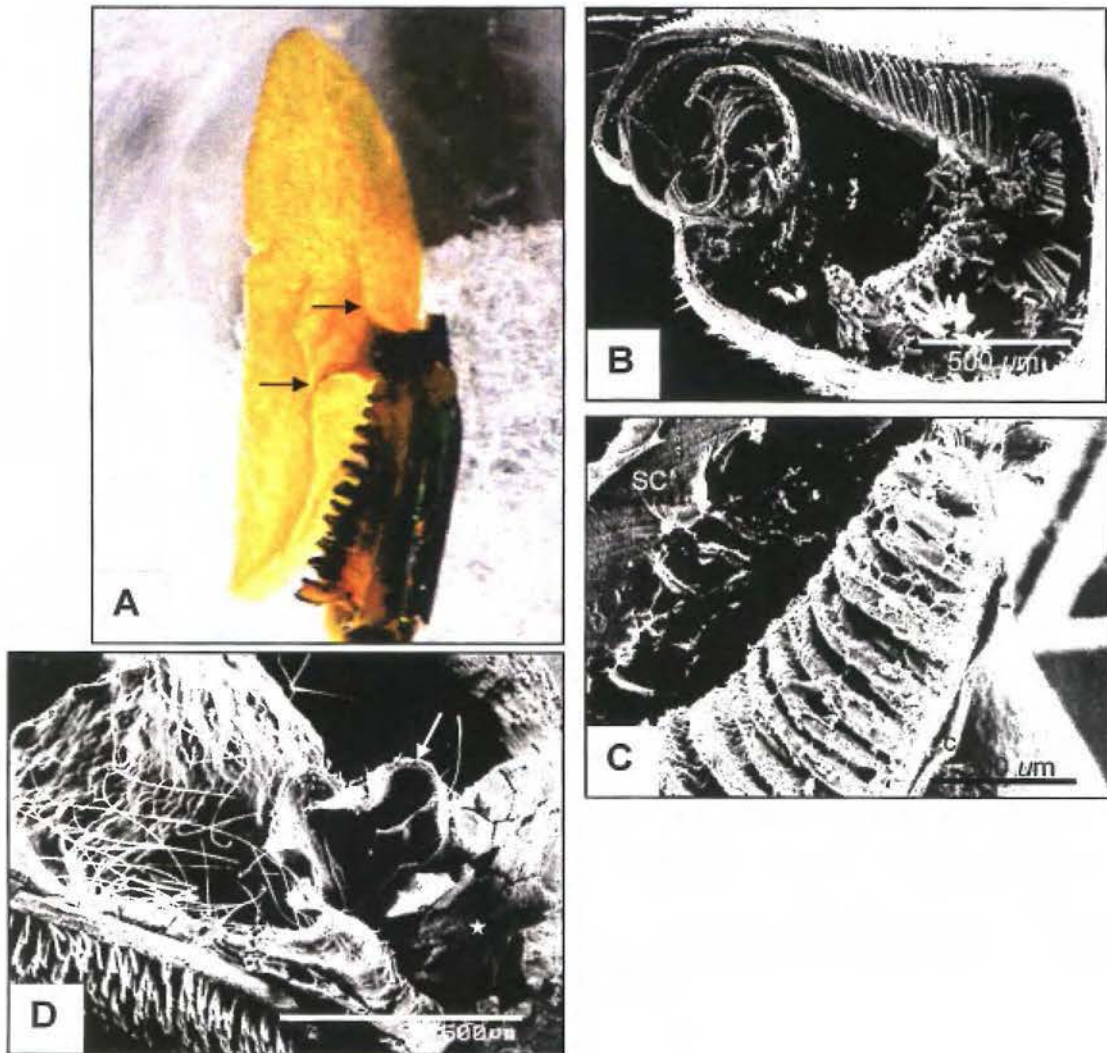


Figura 9.

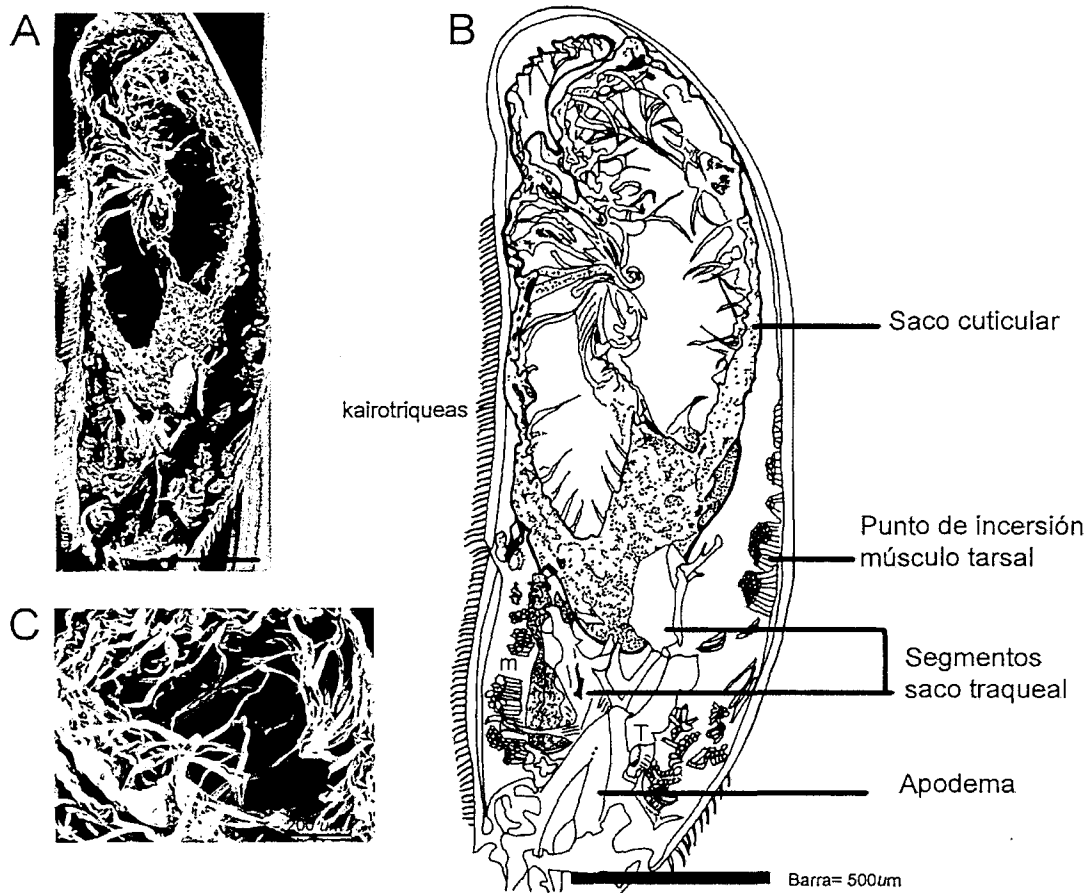
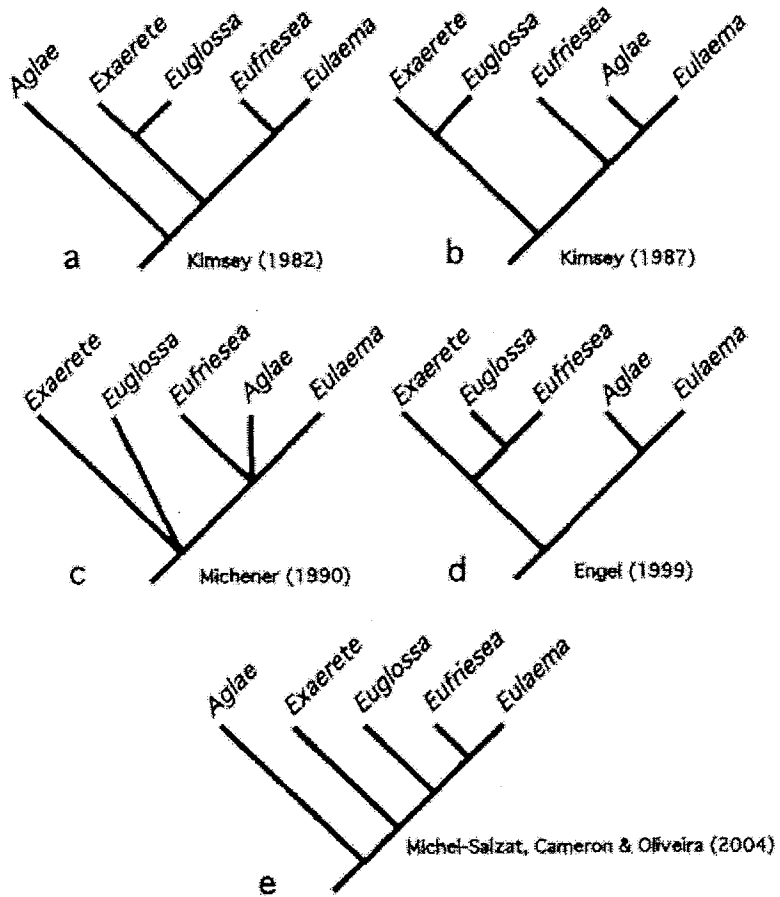


Figura 10.

**APENDICE**

**Apéndice I.** Diagramas de filogenias propuestas para las relaciones genericas en Euglossini. (tomado de Cameron 2004)





**ARTÍCULO 2:** BIOLOGÍA DE UNA LARVA POLINÍVORA, *Allograpta micrura* (DIPTERA: SYRPHIDAE), EN FLORES DE *Castilleja talamancensis* (SCROPHULARIACEAE).

Formato sugerido por la revista "Studia Dipterologica"

**Biology of a pollen feeding hoverfly larva, *Allograpta micrura*  
(Diptera: Syrphidae), on *Castilleja talamancensis*  
(Scrophulariaceae)**

by

**Ju Lin WENG**

San José (Costa Rica)

**Summary:** *Allograpta micrura* larvae feed on pollen of *Castilleja talamancensis* in the highlands of Cerro de la Muerte. All larval instars were found inside flower buds, flowers and fruiting structures. Adults also feed on pollen and nectar of *C. talamancensis* plant as well as on flowers of other species. Usually, only one larva was found inside a given flowering or fruiting structure. Larvae use the sclerotized tips of the labrum and labium to pierce the theca and scoop up pollen. Larvae only partially digest pollen and did not damage other reproductive organs of the flower during the feeding process. Defecation occurs several times prior to pupation perhaps to accommodate the large amount of pollen they consumed. Pupation lasted from 9 to 13 days in the laboratory (20 °C), although no puparia were found in the field. Larvae consumed several flower structures, and tend to move between structures at night.

**Resumen:** Larvas de *Allograpta micrura* comen polen de *Castilleja talamancensis* en Cerro de la Muerte. Las larvas fueron encontradas en botones, flores y frutos, aunque fueron mas abundantes en botones cerrados. Los adultos también se alimentan en flores (polen y néctar) de *C. talamancensis*, como en las flores de otras especies. Generalmente solo una larva se encuentra en la estructura floral o fruto. Larvas utilizan las puntas fuertemente esclerotizadas de labro y labio para perforar la teca y comer del polen. Ellas solo digieren parcialmente el polen y no dañan otras partes reproductivas de la

flor durante el proceso de alimentación. Larvas defecan varias veces antes de pupar probablemente para deshacerse de los granos no digeridos acumulados en el tracto digestivo. El período de pupa fue de 9 a 13 días en condición de laboratorio (20 °C). Ningún pupario ha sido encontrado en el campo.

**Key words:** Pollen feeding larva, hover fly, insect-plant interaction, feeding behavior, Costa Rica.

## Introduction

Hoverflies are common flower visitors that inhabit most terrestrial ecosystems (ROTHERAY 1993). Adults and larvae are of economic interest due to their contributions as pollinators and as predators of crop pests (e.g. aphids) (GILBERT 1986). Adult flies feed mainly on nectar and pollen, although they also feed on bird droppings and aphid honeydew (GILBERT 1986). In most species, both sexes need floral nutrients (i.e., amino acids and carbohydrates) in order to mature their reproductive systems. Larvae have a broad range of feeding habits including phytophagy, mycophagy, saprophagy, scavengers, filter feeders on decaying matter, and carnivores (GILBERT 1986, ROTHERAY 1993). Aphidophagous larvae are the best studied because they are readily observed and because of their potential for controlling crop pests (GILBERT 1986).

In this paper we report on the biology of a pollen-feeding larva of a widespread neotropical species, *Allograpta micrura* Osten Sacken, 1877. Pollen feeding is not uncommon for many immature insects, but among hover flies such a diet is rare in larval stages. A North American species, *Toxomerus* (*Mesogramma*) *politus* Say, has been reported feeding on maize pollen (RILEY & HOWARD 1888; RICHARDSON 1915; HEISS 1938), and *Toxomerus musicus* Fabricius has been observed feeding on grass pollen in Costa Rica (T. Chavarría, pers. comm.). Until recently, larvae of *Allograpta* species were

considered to be exclusively predatory (NISHIDA et al. 2002). The present study represents the first documentation of larval pollen feeding in the genus, and the second report of phytophagy, the first being the leaf-mining species, *A. centropogonis* (NISHIDA et al. 2002). It seems likely that this large and variable genus includes a diversity of feeding habits.

## Methods

**Host plant:** The genus *Castilleja* (Scrophulariaceae), often known as paintbrush or indian paintbrush, includes about 20 species in the neotropics (MAAS & WESTRA 1993). Six species occur in Costa Rica from 700 to 3700 m (BARRINGER & BURGER 2000). *C. talamancensis* is an endemic shrub about 0.3 - 1.5 m tall, simple or with multiple distal branches, that grows in open or partially shaded sites in high mountain forests and paramo formations (2600 – 3200 m) and is limited to the Talamanca mountain range in Costa Rica (BARRINGER & BURGER 2000). The species flowers and sets fruit year round, with a blooming peak at the onset of the rainy season. The inflorescences are terminal racemes, 2 - 10 cm long with conspicuous flowers and with red and yellow leaf-like bracts. The light yellow flowers are covered by the calyx, which is 14 - 20 mm long and 3 - 4 mm in diameter, and red with green tinges and a yellow distal margin. The corolla is a green tube about 20 - 32 mm long. Flowers are visited by both hummingbirds (i.e. *Selasphorus flammula* (Trochilidae), WOLF et al. 1976) and bumblebee species, but are more likely be pollinated by the former (BARRINGER & BURGER 2000).

**General description of the study sites:** The study was conducted on Cerro de la Muerte (2660 – 3250 m), in the Cordillera de Talamanca, Costa Rica. Most field observations were made near the Estación Biológica Cerro de la Muerte (3050 - 3100 m altitude, 9°33' N 83°44' W) in March, May, July, August, September, October 2002, February, March of 2003, and February of 2004. At

the closest meteorological station located in Villa Mills (1 km from Estación Biológica Cerro de la Muerte, IMN 1988), the annual mean precipitation is 2812 mm with two marked seasons. During the dry season (January through March) the temperature occasionally decreases to - 3 °C at night. The annual mean temperature is 10.9 °C but fluctuates considerably throughout the day (e.g. 22 °C during the day to 6 °C at night, KAPPELLE 1996).

Two dominant types of vegetation are found in the study area (KAPPELLE 2001): the high mountain cloud forest and the paramo. *C. talamancensis* occurred in forest openings and edges and are also abundant along the disturbed margins of the Pan-American Highway. Some common plants found close to *Castilleja* plants are shrubs of *Pernettya* (Ericaceae), *Vaccinium* (Ericaceae), *Hypericum* (Hypericaceae), *Rubus* (Rosaceae) and herbaceous plants such as *Valeriana* (Valerianaceae), *Geranium* (Geraneaceae), *Alchemilla* (Rosaceae), *Salvia* (Lamiaceae), *Calceolaria* (Schrophulariaceae), *Fuchsia* (Onagraceae), and other herbs of the family Asteraceae. Flowers of these plants were checked for *A. micrura* larva.

Larvae were collected from *C. talamancensis* flowers at other localities within the same mountain range: 1- Road to the radio/microwave towers on the Paramo area (3300 m) in March and September 2002, and February 2003; 2- Villa Mills (3000 m) in March, May and September 2002, and February 2003; 3- Reserva Tres de Junio (2660 m) in September 2002; 4- Reserva Biológica Cuericí (2800 m) in February 2003.

**Taxonomy:** Terminology for the immature stages follows ROTHERAY (1993).

**Biology:** Flower buds, flowers, and the space between calyx and the fruit of *C. talamancensis* were checked for holes made by the larva of *A. micrura*, then opened to verify the presence of a larva inside. Also, more than thirty plants were checked for pupa at the Cerro de la Muerte site. Dead leaves, mosses,

lichens, and dirt (5 -10 cm depth) within a radius of 30 cm beneath the main stem were removed and examined for the same purpose. Eggs and larvae (boiled for several minutes) were preserved in 70 % alcohol following Rotheray's method (1993). The larvae were pressed gently to help extend the thoracic segments. Some eggs and larvae were dried with a critical point dryer and covered with Gold-Paladium for observation under the scanning electron microscope (Hitachi S-2360 N). Larvae and reared adults are deposited in the insect collection of the Zoological Museum of the University of Costa Rica, the Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), and the National Museums of Scotland.

During February 2004, eighty infested buds and flowers were collected from Cerro de La Muerte to examine the size of floral structures and the length of the larva found inside. The corollas and calices were measured along their longest axes, and the larvae found in each flowering structure were also measured after being boiled. Three larval stages were distinguished using the length of the head skeleton, and the fused posterior respiratory process also serves to identify third instar larvae. Lengths of calyx and corolla tube were compared with larval length by a simple regression analysis.

To examine the larva-plant relationship, sixty nine flower racemes (main flower units located within the inflorescence) of *Castilleja talamancensis* were collected at Cerro de la Muerte: fifty racemes from five plants during April, 2002, and nineteen racemes from five other plants during February, 2004. Each bud (longer than 2 mm), flower, and fruit was examined under a dissecting microscope shortly after collection to check for the presence of eggs or larvae. Plant reproductive structures were classified into five categories: "closed bud" (calyx still sealed), "open bud" (calyx with clefts but corolla not protruding from the calyx), "flower" (upper lip of corolla exposed beyond calyx), "fruit" (flower wilted and ovary swollen), and "dead structure" (dried or necrotic bud or flower).

The frequencies of different structures were compared between racemes with and without larvae, using a chi-square test for independence.

To observe the tolerance of *A. micrura* larvae to overnight low temperature, 25 larvae were removed from the floral structures and placed in a petri dish (*Castilleja* leaves added for humidity) and another 25 larvae inside the host structures were placed in another petri dish. Both dishes were wrapped in a humid towel and kept inside a refrigerator (~ 4 °C) for eight hours. Larvae were examined immediately afterward and after gradual warming by placing both dishes inside a small cooler without ice.

In order to test for aphidophagy, larvae of second and third instars were experimentally placed with aphids in San José. Groups of three and two larvae were placed each one in a small petri dish (five centimeters in diameter and one centimeter tall). Ten aphids (from *C. talamancensis* and *Citrus*) were placed in each dish and fresh leaves and calyces of *Castilleja* were added to maintain humidity and shelter for larvae. Aphids were counted every morning for two consecutive days. In addition, larvae were also placed with small flies since one Costa Rican species of *Ocyptamus* has been observed preying on adult *Drosophila* (O. Ureña, in prep.). To test for fly predation, a group of four larvae was placed with ten small gregarious chloropid flies (ca. 1 mm, found in *Fuchsia splendens* flowers at Cerro de la Muerte) and another group of five larvae was placed with five *Drosophila melanogaster*, both were observed for two consecutive days. Additionally, four larvae were placed with *Castilleja* flowers and aphids and another group of four larvae with *Castilleja* flowers and *D. melanogaster* to observe feeding preference for the same duration.

More than thirty larvae collected with *Castilleja* flowers in plastic bags, were reared in the laboratory at the University of Costa Rica, San José (1150 m). Larvae (n= 9) from three different stages were kept in petri dishes with host plant inflorescences to observe their searching and feeding behavior. Feeding

behavior of third and second instars larvae were recorded using a video capture device (Sanyo VCC-3912) attached to a stereo microscope (Nikon SM2-1) and connected to a video recorder (Sony). Ten larvae ready to pupate were kept in a dark cooler (8 - 10 °C ) to compare pupal duration against those pupating at room temperature (~20 °C).

Recently excreted frass was collected for observation, and for comparison with fresh pollen from flowers and buds. Samples of six frass and pollen masses from anthers of five mature flowers and five closed buds were placed on slides with a drop of tap water and two drops of Lactofenol Cotton Blue (0.03%) stain. Frass samples were collected within a few minutes after being voided to avoid desiccation of the pollen grains. Thirty pollen grains were observed from each sample and pollen size, cell wall integrity and the cell content were compared qualitatively.

Adult behavior was observed at the Cerro de la Muerte site during the day. About fifteen adult flies were observed feeding on flowers and were collected to confirm species identity. Males of *A. micrura* were observed in hovering flight near road sides, and the behavior of other flies was observed within a radius of about two meters. Adults of *A. micrura* were followed and when they landed they were sexed (using the size and separation of the compound eyes).

Inflorescences of *C. irazuensis* from Volcán Irazú National Park were also examined for larvae during October 2002. Third instar larvae were raised to obtain adults for species confirmation. *Castilleja irazuensis* also occurs in the Talamanca mountain range and may hybridize with *Castilleja talamancensis*, making the two species difficult to distinguish (Barringer and Burger 2000). I will consider all plants from the study sites in the Talamanca mountain range to be *C. talamancensis*. Plant specimens are deposited in herbarium of the University of Costa Rica.



## Results

### Description of the third stage larva and puparium

**Overall appearance:** A subcylindrical, white to yellow larva (Fig. 1.A) generally turning green (Fig. 1.B) before pupariation with an inconspicuous sheet of whitish fat covering the hind gut; tapering anteriorly, truncate posteriorly; locomotory organs barely protruding and lacking prolegs and crochets; papillae bearing antennomaxillary organs subcylindrical and appearing above the mouth (Fig. 1.C); apex of head skeleton with labrum and labium pointed and distinctly upcurved (Fig. 1.D); mandibles present as curved, brown sclerotised rods encased within fleshy, laterally flattened projections that appear at the lateral margins of the mouth and are attached to the base of the papillae supporting the antennomaxillary organs; posterior breathing tube longer than basally broad and bifurcated at apex; spiracular plates with ecdysial scar at dorso-lateral margin (Fig. 1.E).

**Third stage larva:** Length 3.4 – 11 mm (n= 37); subcylindrical in cross section, tapering anteriorly, truncate posteriorly. Dorsal and lateral sensilla accompanied by single apical setae and mounted on a projection about as long as apical setae. Pattern of segmental sensilla as for other syrphid larvae (ROTHERAY & GILBERT 1999).

**Head:** Antennomaxillary organs mounted on laterally flattened papillae that surround the lateral margins of the mouth. **Head skeleton:** Length 0.70 mm; arrangement similar to other syrphines (HARTLEY 1963, ROBERTS 1970), i.e. labrum and labium elongate and equally produced at the apex of the head skeleton (Fig. 1.F), which is highly modified. Apex of labium flattened into a broad, sclerotised, plate with a three-pronged apex consisting of a large central projection and two, short, lateral projections (Fig. 1.F). Posterior corners of the labium articulating with the tentorial arm. Apex of the tentorial arm also articulating with the mandibles. Mandibles appearing as curved, brown

sclerotised rods encased within fleshy, laterally flattened projections that appear at the lateral margins of the mouth and are attached to the base of the papillae supporting the antennomaxillary organs. Apices of the labrum and labium slightly but distinctly upcurved. Apodemes supporting labrum strongly sclerotised and extending back almost to the posterior end of the ventral cornu. Ventral cornu with a sclerotised area towards posterior margin. Ventral bridge not strongly sclerotised mid-ventrally. Dorsal cornu narrower and about 0.6 as elongate as ventral cornu.

**Thorax:** Antero-dorsal margin of prothorax with pale brown spicules. Apico-lateral and apico-ventral margins of prothorax papillate. Lateral lips fleshy, lacking sclerotisation. Anterior spicules at posterior margin of prothorax with 4 openings. Rest of thorax with coriaceous transverse bands alternating with clear bands corresponding to where the integument folds during movement. Ventral surface of mesothorax with a pair of raised pads.

**Abdomen:** Abdominal segments 1-7 with four transverse dorsal folds between which are coriaceous transverse bands and no other vestiture. Paired locomotory prominences on abdominal segments 1-7 bearing sensilla 9 and 10.

**Anal segment:** about equally developed dorsally and ventrally with two dorsal and three ventral folds. Apex bearing a pair of bar-like locomotory lobes. Anal opening transverse. **Posterior breathing tube:** Length 0.58mm; basal width 0.30mm; apical width 0.35mm (n = 2). Base nodulate, smooth and shiny above and bifurcated at apex (Fig. 1.E). Each spiracular plate with ecdysial scar at dorso-lateral margin, three elongate-oval spiracular openings with dark to blackened margins extending over the sides of the spiracular plate and four interspiracular nodules bearing setae, setae often absent.

**Puparium:** Length  $5.8 \pm 0.4$  mm (n= 20). Anterior end inflated and arched dorsally (Fig. 2.A). Integument translucent to mottled with pale and dark brown blotches. Pupal respiratory processes absent. Spiracular openings black margined and interspiracular nodules and spiracular plate mostly black.

## Egg and oviposition

The eggs are subcylindrical to oval-shaped, and about 1 mm long. Up to two eggs and four empty shells were found on a given raceme. Eggs were attached mainly to the bracts of inflorescences, bud and flower calices, and also occurred on the branches and the main rachis. Eggs were “glued” to the surface of the plant and a whitish residue remained after the egg shells had fallen.

Egg color changed as eggs matured. Ten white colored eggs brought into the laboratory remained white for two to three days, and then became iridescent a few days before larval eclosion. The iridescence disappeared after the larva emerged and a loose gray membrane remained inside the empty chorion. A uniform scale-like sculpture on the egg surface (Fig. 2.B) is visible under a dissecting microscope. This regular sculpture may contribute to the optical effect and also function as a hydrophobic surface as in the petals of many flowers (Endress 1994). Electron microscopy revealed a ridge-like structure at one end surrounding a depression which is probably the micropyle (Fig. 2.B).

Females of *A. micrura* (n= 8) flew repeatedly around the racemes and landed on the colorful bracts and other floral structures of *C. talamancensis*. Oviposition (observed twice) took place after more than twenty minutes of inspection of an inflorescence and nearby branches.

## Biology

Eggs and larvae of *A. micrura* were found on inflorescences of *C. talamancensis* from grouped bushes, solitary plants, and even on plants less than 30 cm tall bearing only one inflorescence. About half amount (57%) of forty - six racemes with one to fifteen reproductive structures (buds, flowers and fruits), sampled from five plants, was found with egg(s) on bracts, larva(e), or both. Most larvae were located inside the corolla tube of flower buds and flowers by tearing open

the host structures longitudinally. Some early first instar larvae were even found feeding totally inside the anthers after chewing through the thecae. A few individuals were found between the calyx and corolla, and also within the persistent calyx of wilted flowers and developing fruits. Larvae were observed in the process of chewing through the calyx and corolla of the “closed buds”. When the calyx of flower buds had small round and irregular shaped holes (Fig. 2.C), larvae were usually found inside. In “open buds” and “flowers”, larvae were observed following the lower cleft of the calyx to reach the corolla tube. The presence of fresh holes of similar diameters associated with the larva inside suggested that they also sometimes chew the tissues in order to enter. In open buds and flowers larvae were either near the ovary, in basal portion of corolla, or feeding in anthers located in the distal portion of the flower. Larvae inside undeveloped buds were either in a small space close to the anthers, or inside the thecae. Usually, only one larva was found in each flower or fruit structure. On a few occasions, two larvae were found inhabiting the same flower structure but were not seen in contact. No larvae were found in the other 30 blooming plant species examined (ten to 20 flowers from a minimum of five individuals per species were randomly picked for examination from forest and open areas).

A thin film of humidity was observed covering larvae found in flowers. This film disappeared a few hours after the larvae were placed alone inside petri dishes; the integument turned dull and lost transparency, and larvae became dorsoventrally flatter when resting. Larvae recovered the shiny appearance when wetted. A clear secretion rapidly covered the larva when it was disturbed and started to move away. The origin of this secretion is not clear. It was less viscous than the saliva produced when the larva was disturbed.

## **Pupation**

Early third instar larvae were yellowish and under laboratory conditions turned bright green four (n = 2) to ten days or more (n = 9), after feeding on the

anthers of at least two fully developed flowers. Larvae then pupated three to six days later ( $n = 7$ ). Larvae apparently searched for a site to pupate by moving rapidly, waving from side to side with the extended thorax, and tapping against the surface. Searching lasted from a few hours to a day. No evident dorsal discs were seen on the first abdominal segment when the larvae were ready to pupate, as seems to be common in other Syrphini. When a larva found a pupation site, it assumed a resting position with the prothorax bent under the meso- and metathorax, and remained still for about 10 to 15 hours prior to pupariation. Puparial dimensions did not differ between sexes (Table 1).

Pupation under laboratory conditions took place on the sides of plastic bags and other container walls, on small twigs, fresh leaves, within the flower or fruit calyx, and in debris. Larvae rarely remained on exposed branches to pupate; apparently they prefer to bury themselves under loose and moist debris. I failed to find pupae in nature despite intensive search on and near *C. talamancensis* plants

A thin layer of a clear hardened substance, presumably an anal secretion, surrounded the ventral middle to posterior portion of the puparium, and glued it to the substrate. Coloration of puparia formed in captivity varied, apparently in accord with the color of the substrate; pupae in clear containers like transparent bags or petri dishes were translucent white ( $n= 30$ ), while pupae hidden in debris ( $n=35$ ) were brown (round dots to irregular patches). Pupal duration ( $n= 35$ ) ranged from 9 to 13 days under laboratory conditions, and the range was the same for specimens ( $n=10$ ) reared in a cooler (5-7 °C). Pupation of specimens collected in *C. irazuensis* also lasted nine to twelve days ( $n=3$ ).

### **Larva-plant relationship**

In two surveys conducted at Cerro de la Muerte, 56.7% of 69 racemes of *C. talamancensis* had eggs (7.5%), larva(38.8%) or both (10.4%). One to four

larvae occurred in each occupied raceme; the number of larvae did not increase according to the number of reproductive structures in the raceme ( $R^2 = 0.015$ ,  $F_{(1,31)} = 0.46459$ ,  $p < 0.50$ ). The number of reproductive structures did not vary between occupied (mean  $\pm$  S.D. =  $6.61 \pm 3.37$ ,  $n = 33$ ) and unoccupied racemes (mean  $\pm$  S.D. =  $5.32 \pm 3.30$ ,  $n = 31$ ;  $t = 1.54$ , d.f. = 62,  $p = 0.13$ ). “Closed buds” were the most abundant structures on occupied racemes (28.4%), but larvae tended to occur in “open buds” and “flowers” about twice as much as expected,  $\chi^2 = 52.73$ , d.f. = 4,  $p < 0.001$ ,  $n = 55$ ; Fig. 2.D). No larvae were found in dead or dried buds and flowers.

The length of different stages larva overlapped, particularly between the second and third instars (Fig. 3). However, larvae of all instars occurred in “closed buds”, “open buds”, and “flowers” (Table 2). First instar larvae were more frequently found in “closed buds” (81.6%), while third instar larvae occurred mostly in “flowers” (58.8%,  $\chi^2 = 34.5$ , d.f. = 4,  $p < 0.005$ , Table 2). The mean length increased significantly from the previous stage to the next ( $F_{(2,77)} = 165.2$ ,  $p < 0.00001$ ; Duncan posteriori test  $p < 0.0005$ ; Table 3), although larval length overlapped between the three instars. The size of larvae was positively related to the length of the corolla (Adjusted  $r^2 = 0.36$ ,  $n = 80$ ,  $p < 0.0001$ ,  $F_{(1,78)} = 46.0$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 4) and the calyx (Adjusted  $r^2 = 0.30$ ,  $n = 80$ ,  $p < 0.0001$ ,  $F_{(1,78)} = 213.0$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 5) of their hosting structures. However, small flower buds usually hosted only small larvae whereas more developed structures hosted larvae of different sizes. Specifically, the length of the corolla was significantly related to the size of the larva inside “closed buds” (Adjusted  $r^2 = 0.39$ ,  $F_{(1,36)} = 25.01$ ,  $p < 0.0001$ ) and “open buds” (Adjusted  $r^2 = 0.26$ ,  $F_{(1,23)} = 9.53$ ,  $p = 0.005$ ), but it was not related to the size of larvae in “flowers” (Adjusted  $r^2 = 0.15$ ,  $F_{(1,15)} = 3.75$ ,  $p = 0.07$ ). Similarly, the length of the calyx was significantly related to the size of the larva in “closed buds” (Adjusted  $r^2 = 0.23$ ,  $F_{(1,36)} = 12.25$ ,  $p < 0.005$ ) and “open buds” (Adjusted  $r^2 = 0.25$ ,  $F_{(1,23)} = 9.05$ ,  $p = 0.006$ ), but not in “flowers” (Adjusted  $r^2 = 0.11$ ,  $F_{(1,15)} = 2.94$ ,  $p = 0.11$ ).

No larvae were observed outside of flowering structures in the field during the day. Larvae raised in the laboratory were rarely observed out of *Castilleja* flowers but were usually found shifted into another flower structure a day after the pollen was consumed. In order to observe the response of larvae to light when outside the flower structures, thirty larvae of second and third instars were taken out of their hosting flowers, placed in the lower portion of the main rachis of an erect raceme, and observed their behavior for thirty to fifty minutes in the field. Each larva rose up, extended its thorax, and waved from side to side several times before beginning to move along the raceme. Periodically the larva stopped and extended its thorax and tapped rapidly several times against the surface, then waved the thorax from side to side (again touching the surface), and then proceeded in their locomotion. Only twenty two larvae successfully entered a flower within the first fifteen minutes and all of these remained inside the structure after thirty minutes of observation. Fifty percent of these larvae used the closest flower that they found on their way up the stem. Four other larvae examined the closest flower by vigorously tapping a small portion of the flowering structure, but moved away and entered in other flower. The other seven passed by the closest flower without having any contact with it and went into other flowers. On the other hand, eight larvae did not enter any flower structure after fifty minutes of observation; two remained under a bract of the closest flower, and the rest stayed immobile on the same spot or moved up and down for more than thirty minutes and then remained immobile. Temperature and luminosity dropped as wind speed increased in the last quarter part of these observations.

### **Searching and feeding behavior**

Recently hatched larvae (~ 1 mm) remained immobile close to the chorion and rested for several minutes before starting to tunnel through the calyx. They bored into the calyx by holding the body at a right angle to its surface. Larvae may have ingested flower tissue as they bored, because little

debris was seen by the entrance hole, and a dark colored mass was observed in the gut through the transparent integument. Similar dark colored masses were observed in the guts of larvae in captivity that were feeding on flower tissues due to lack of pollen. Boring lasted for ten minutes or more. Sometimes, the larva stopped after it had drilled half way into a bud and moved away, even without apparent disturbance. Some newly hatched larvae moved away from the flower bud, where the egg was laid, and were found inside other floral structures a few hours later.

Feeding was video taped in order to check the sequence in slow motion for a closer view of the mouth parts. Larvae of all stages performed scanning or casting movements by extending and swinging the thorax from side to side. The transparent integument of the larvae allowed observation of the black head skeleton and ingestion of yellow pollen masses. Once the larva reached an anther, it pressed its lips against the theca; it apparently was assisted by a sticky transparent saliva in holding the theca. The tips of both the labrum and the labium were protruded and reached the theca; as the head skeleton moved anteriorly the pointed apex of the labrum reached and pierced the surface first, followed by the labium (see Fig. 6 for feeding details). The extension and retraction movements were performed rhythmically (~ 45 times/ minute), with few pauses, until the theca was almost empty. Then, the larva "licked" the theca using its lips to take the remaining loose pollen grains before abandoning the anther. The pointed labium and labrum were barely protruded during the "licking" process. A third instar larva spent less than thirty minutes to clean the pollen from a fully developed anther.

Some larvae raised in the laboratory also ingested flower and calyx tissues, and rotten leaves; especially when pollen was lacking. These tissues were easily identified inside larval guts as dark colored masses that contrasted with the bright yellow pollen mass. Nectaries from some closed buds and flowers found in the field also exhibited shallow marks. It is not clear whether the



larvae were eating this tissue or whether they injured the tissue during nectar consumption.

Larvae did not prey or feed on either aphids or flies placed with them in petri dishes. In general, they avoided the walking aphids and flies by moving aside or hiding under plant leaves used to provide humidity, and stayed immobile most of the time. When contacted repeatedly by aphids or flies, the larvae repeatedly struck with a fast movement toward the intruder (n= 5), and aphids were hit on three occasions. Larvae moved away after hitting the aphids; a clear sticky liquid was left on the aphid which impeded walking. Larvae placed with aphids and flies together with *Castilleja* flowers only fed on pollen (n= 8).

Feeding trials showed that larvae of *A. micrura* did not feed on pollen or nectar of *Pernettya prostrata* (Ericaceae) or *Fuchsia splendens* (Onagraceae), two common species in all study sites and which bloom abundantly for extended periods at Cerro de la Muerte. In the presence of *Castilleja* flowers a group of seven larvae (late second and third instars) was placed in combination with either of these plants in a petri dish and both groups were checked during three consecutive days for feeding behavior. All larvae moved toward *Castilleja* flowers and fed. Also, two groups of five larvae were placed with introduced ornamental flowers, *Bouganvillea* sp. (Nyctaginaceae), and *Hemerocallis fulva* (Liliaceae), and observed for the same period. Two larvae sucked nectar from *Bouganvillea* sp. and two larvae fed on some pollen from *Hemerocallis fulva*. The larvae that fed on pollen of *Hemerocallis fulva* were dead by the next day, and those that fed on nectar died two days later. The cause of death was not determined. Those larvae that did not feed on pollen or nectar remained immobile in the petri dishes rather than inside the foreign flower structures during the three day period.

## Defecation

Second instar larvae defecated at least once prior to moulting. Third instar larvae defecated at least once before turning green, and again prior to pupation. Larvae emptied all gut contents before moulting, and thus no yellow mass was seen through the transparent integument shortly beforehand. A few minutes after moulting larvae were seen resting close to the frass (about 1 cm) where the skin shedding took place. Moulded skins bearing the head skeleton were found close to the frass inside flowers, both in the field and in the laboratory. Larvae became very active immediately after moulting and started feeding again. Bright yellow frass was also left inside flowers after feeding. Third instar larvae maintained in the laboratory defecated shortly before abandoning the host flowers to pupate.

The bright yellow coloration of the frass is probably due to the oily yellow pigment from the pollenkitt. The same yellow oil pigment was also seen in the fresh pollen samples (Fig. 7.A), but in larger sized drops. Larvae of *A. micrura* seemed to feed on the pollenkitt and also a certain amount of cytoplasm in the pollen. Compared to the pollen from anthers, the pollen from frass had more visible exine (Fig. 7.B). Cytoplasmic material also seemed to be reduced after passing through larval guts (the pollen absorbed less blue dye), but pollen wall ruptures and uneven pore openings were seen only in frass samples. Less than 10% of the grains were broken, and many pollen grains that had no evident wall ruptures nevertheless had a reduced density of cytoplasmic material.

## Predation and parasitism

*Polybia aequatorialis* (Vespidae), a common social wasp at the study sites, seems to employ an effective method for finding larvae hidden inside *Castilleja* flowers. Three wasps were observed inspecting inflorescences that had eggs attached to floral structures. They apparently detect the larva inside

flowers and buds when they bite the flower structures. On one occasion, a wasp apparently detected a larva inside a flower, whereupon she cut the calyx and corolla with her mandibles and pulled out a third instar larva. The wasp subdued the larva within a minute by cutting it into halves, then chewed a section to push out the gut content, and rolled the flat larva into a ball-shaped mass to transport back to the nest. A few minutes later it returned for the piece of larva that was left .

An unidentified species of *Paracaratomous* (Pteromalidae) was the only parasitoid reared from larvae of *A. micrura*. Two early third instar syrphid larvae collected in July at the Estación Biológica Cerro de la Muerte pupated as usual in the laboratory, but wasps emerged from the puparium at its rounded proximal end (Fig. 7.C) 20 to 22 days later. The parasitoid likely oviposited in the early third instar, or before, but emergence is delayed until the host is in its puparium; this parasitoid is therefore a koinobiont. Another early third instar larva collected from Tres de Junio in September was also parasitised, since a small, clear whitish larva was seen in its haemocoel. However, the parasitoid did not survive and a female *A. micrura* emerged after 9 days of pupation.

### **Adult biology**

The abdomen of the recently emerged adults of *A. micrura* is slender in both sexes and no ovarian development was observed through the transparent tergites. Raceme like ovaries were observed ventrally, one on each side of the lower portion of the abdomen, below the fourth and fifth sterna of older females. Three out of eight females captured on flowers in late September had the abdomen swollen with developing eggs. Two dissected gravid females had 15 - 16 relatively advanced eggs which varied slightly in size ( $0.75 \pm 0.2$  cm, mean and standard deviation from 16 eggs of a female).

Both males and females frequently fed on open flowers of different species, such as *Geranium guatemalensis* and *Valeriana* spp. They also fed from more tubular flowers (i.e., *Pernettya prostrata* and *Castilleja talamancensis*) while hanging upside down from the ventral part of the flower, and using the long proboscis to take the pollen and nectar (Fig. 7.D). Males and females with and without developed eggs fed on the same host plants.

Males hovered in sunlight in open areas (trails) about 40 to 60 cm from *C. talamancensis* bushes (0.5 – 1,5 m above the ground). Hovering males chased flying insects, even bumble bees. Males decamped on several occasions when the sunlight was diminished by passing by clouds. A few females also rested on exposed leaves and fed on flowers located near hovering males (about a meter or more). They flew slowly and very close to the bushes. On one occasion, a female passed rapidly in front of a hovering male and landed on an exposed branch. The male flew toward her and landed nearby. Mounting occurred immediately and copulation began shortly thereafter. The female then walked deeper into the plant, and the pair disappeared from sight.

## Discussion

The larvae of most *Allograpta* species that have been studied are aphid predators (THOMPSON et al. 2000, ROTHERAY & GILBERT 1999), although phytophagy was recently documented in the leaf-mining *A. centropogonis* (NISHIDA et al. 2002). *A. micrura* represents the first case of pollen feeding in this genus. The larvae appear to obtain nutrients from the pollenkit and also the cytoplasm, probably using osmotic shock (NICHOLSON 1994), the same method used by adult flies to obtain access to cytoplasm without breaking the pollen wall (CHAPMAN 1998). However, they also consumed nectar and plant tissue from *C. talamancensis* to some extent. Aphids and small flies, on the other hand, are not likely to be part of the diet of *A. micrura* larvae, as confined

larvae starved or fed on rotten plant tissues rather than prey on them. Defensive behavior was observed when it rapidly retracted its anterior segments, and regurgitated a sticky clear saliva that was placed on passing aphids. This behavior was observed also when larva was attacked by a wasp. This saliva is probably the same used to hold the theca during anther perforation, since the sticky saliva's twofold function is also observed in predatory species to hold prey and for defense (ROTHERAY 1993).

Unique morphological features of the head skeleton are present in *A. micrura* larva that reflect their ability to feed on pollen. The labrum is large and heavily sclerotised and has very long and broad apodemes that extend back and are attached near the posterior margin of the ventral cornu. A strengthened labrum is presumably an advantage in tearing plant tissue. The mandibles are encased in a fleshy projection. These fleshy projections lie on each side of the mouth and the functional advantage of such fleshy organs is presumably in relation to gathering pollen grains into the mouth. The shape of the labium is also unique in being a flattened 3-pronged structure instead of the unusual tapering knife-like structure as in most other syrphines. This shape is also probably adaptive for tearing plant tissues and gathering pollen masses into the mouth. The pointed and slightly curved ends of the labrum and labium of *A. micrura* resemble those of aphidophagous species, and are used to pierce and tear apart the theca. However, they differ from aphidophagous larvae in the way they ingest food; while aphidophagous larvae feed by imbibing the body fluids and internal tissues by holding the prey (ROTHERAY 1993), *A. micrura* larvae scoop the pollen by extending the thoracic segments into the pollen mass. In contrast to other phytophagous larvae such as *Cheilosis grossa* (ROTHERAY 1993), *C. semifasciata* (ROTHERAY 1988), and *A. centropogonis*, hook-like mandibles are not present in *A. micrura*, probably because the pollen mass is less compact and, usually, they do not rasp plant tissues or puncture fluid-filled cells for food. Unlike predaceous Syrphinae and the leaf-mining *A. centropogonis*, *A. micrura* defecates many times during its larval development

(ROTHERAY 1988, NISHIDA et al. 2002). A large portion of the pollen, including the pollen wall (sporopollenin), is not digestible by the larvae, and more frequent defecation probably allows more pollen intake.

Larvae showed high specificity toward *C. talamancensis* flowers, and were found feeding on the anthers of flowers and even in barely developed buds. Larvae were not found in other species of flowering plants in the study sites and preliminary observations suggest that larvae are not likely to feed on other flowering species sharing the same habitat. Year round flower availability probably favored *A. micrura* to use flowers of *C. talamancensis* over other abundant but seasonal species. However, nutritional values and pollen toxicity can also be factors that limited exploitation of other flowering species. Preliminary observations suggest that after consuming pollen or nectar of other plants, larvae died more quickly than starved ones.

Larvae were always found inside cavities within flowering or fruiting structures which hide them from sight, even inside those without any food resource, such as wilted flowers. They seem to exit the flowering structures only for searching pollen and pupation, and were more likely to exit in the dark, since they were never seen out of flower structures during day time. Molting events and defecation also take place inside the flowering structures. One adaptation to live inside these cavities seemed to be the fleshy base of the protruding posterior respiratory process in third instar larvae, which is sclerotised in most syrphines. This unusual feature is also present in the leaf-mining larva *A. centropogonis*. The fleshy base provides flexibility in horizontally lowering the respiratory process to body level, and to ease movement while boring through the flower walls as well as inside flower buds. *A. micrura* larvae of all stages fed in little developed flower buds to fully mature flowers, although larger larvae tended to use more developed structures. The tube shaped corolla of blooming flowers seem to provide a more suitable cavity for bigger larvae. Moreover, they probably protect larvae against low temperature, below zero degree Celsius in

the highlands. Exposure to 4 – 5 °C for 12 hours was lethal for experimentally uncovered larvae, but did not kill those that remained inside flower structures.

A single egg was laid per oviposition event. There is no evidence that females discriminate between occupied and unoccupied inflorescences, and some had up to four eggs. The number of flowers per inflorescence is not likely to be a major criterium for oviposition, since eggs were found on single flower inflorescences, as well as on large racemes bearing about fourteen flower structures. Although several eggs were laid close together, a single larva was usually found per flower. Larvae probably avoid sharing the limited pollen that is easily consumed within an hour by a third instar larva.

Pollen and nectar consumption by *A. micrura* probably affects the fitness of *C. talamancensis*, a hermaphroditic plant. A similar situation occurs in *Centropogon solanifolius*, which is attacked by a drosophilid larvae, *Zygothrica neolinea* (WEISS 1996), in which different stages of larvae also infest all stages of flower structures. Floral feeding insects in general can affect the reproductive capacity of plants by shortening the duration of the flower's male phase (even causing it to disappear completely) and reducing plant fitness by impeding a proper relation with the pollinators (i.e., larval reaction against visitors and pollen-nectar depletion), and possibly affecting other interactions like mutualism and parasitism (STRAUSS 1997, STRAUSS & ZANGERL 2002). Further observations are needed to understand how the larvae of *A. micrura* influence the fitness of *C. talamancensis* and how a reduction in the male phase of numerous flowers influences the population dynamics of the plant.

Another interesting question that remains is concerning the food items of *A. micrura* larvae in other geographic localities where *C. talamancensis* is not present. *A. micrura* is a wide spread species that has been reported from southern United States to South America, and in Costa Rica it has been collected from middle elevation (1200 meters above sea level) to the summits of

the Talamanca mountain range (3600 m). Both *C. talamancensis* and *C. irazuensis* are endemic species that are found above 2600 m (BARRINGER & BURGER 2000), which is more restricted than the altitudinal distribution of the fly.

### **Acknowledgements**

I want to thank Graham Rotheray for the description of the larva and Federico Valverde for his generous logistic support and hospitality in the Estación Biológica Cerro de la Muerte. Thanks are also due to Manuel Zumbado for the insight about the life history of syrphid larvae and the identification of adult *Allograpta micrura*; to P. Hanson for the identification and information about parasitoids, and to G. Barrantes, C. Morales and J. Gomez Laurito for plant identification. I also thank W. Eberhard and P. Hanson for their excellent comments and ideas for this project, as well as help in English and review of the manuscript, and K. Nishida for sharing information and excellent photographs. Thanks to I.N.Bio for the inventory of plants and fly collecting data (A.T.T.A. project) and to O. Ureña and T. Chavarría for sharing information about *Ocyrtamus* sp. and *T. musicus* respectively. I want to especially thank G. Barrantes who encouraged me to develop this research, and provided constant discussion and accurate comments about the project.



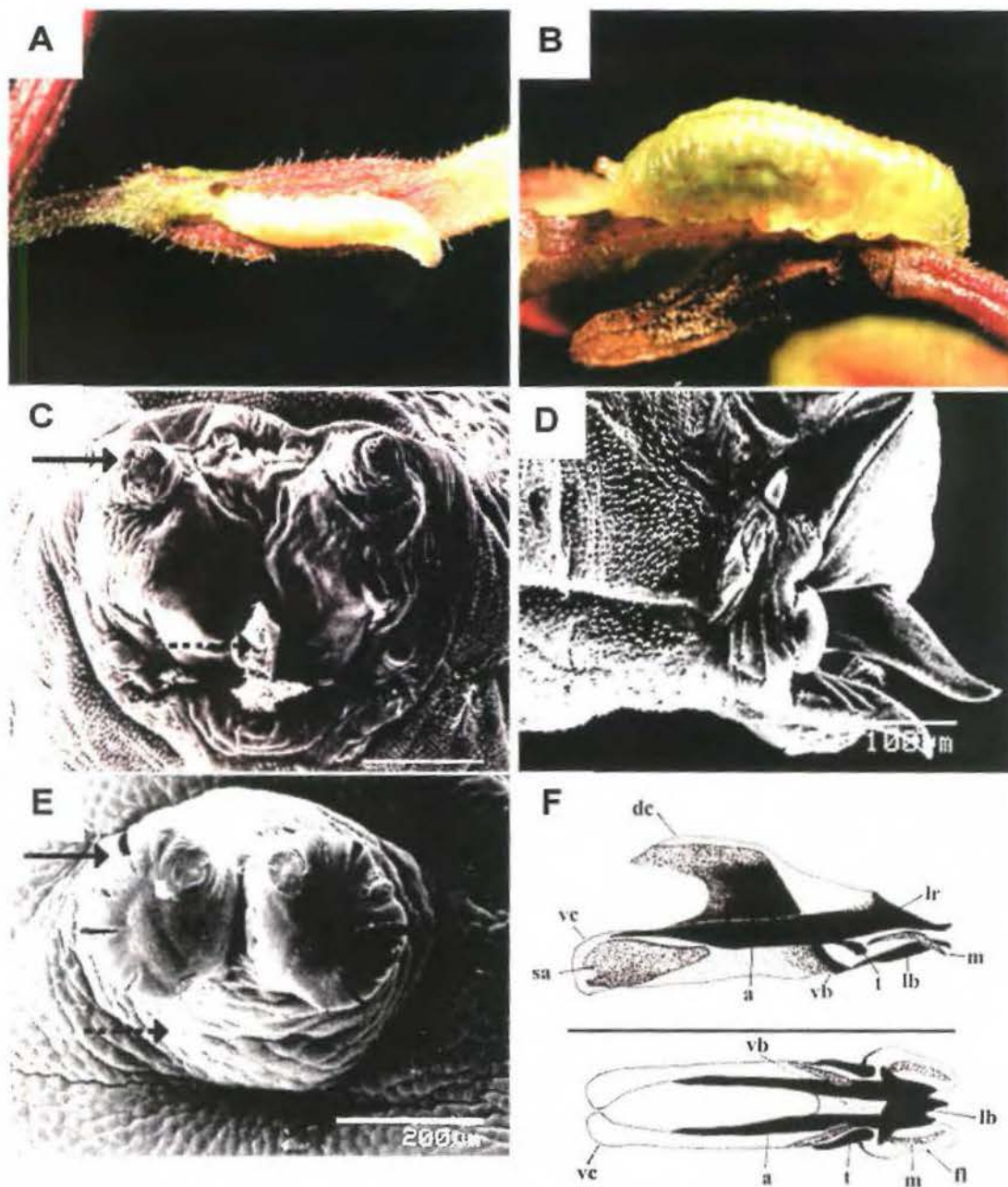
## Literature

- BARRINGER, K. & BURGER, W. (2000): Family # 193 Scrophulariaceae. Pp: 32 – 36: W. Burger (ed.) Flora Costaricensis. Fieldiana - Botany New Series, No. 41. Field Museum of Natural History.
- CHAPMAN, R. F. (1998): The Insects. Structure and Function. + 770 pp. Cambridge Cambridge University Press.
- ENDRESS, P. K. (1994): Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers. + 511 pp. Cambridge. Cambridge University Press.
- GILBERT, F. (1986): Hoverflies. Naturalists' Handbooks 5. + 66 pp. Cambridge. Cambridge University Press.
- HARTLEY, J. C. (1963): The cephalopharyngeal apparatus of syrphid larvae and its relationship to other Diptera. – Proceedings of the Zoological Society of London **141**: 261-280; London.
- HEISS, E. M. (1938): A classification of the larvae and puparia of the Syrphidae of Illinois exclusive of aquatic forms. Contribution from the Entomological Laboratory of the University of Illinois **187**: 142 pp. The University of Illinois Press, Urbana.
- INSTITUTO METEOROLÓGICO NACIONAL. 1988. Catastro de la serie de precipitaciones medidas en Costa Rica. + 363 pp. San José. Ministerio del Ambiente y Energía.
- KAPPELLE, M. (1996): Los bosques de Roble (*Quercus*) de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica. Biodiversidad, ecología, conservación y desarrollo. + 336 pp. Amsterdam & Heredia. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).

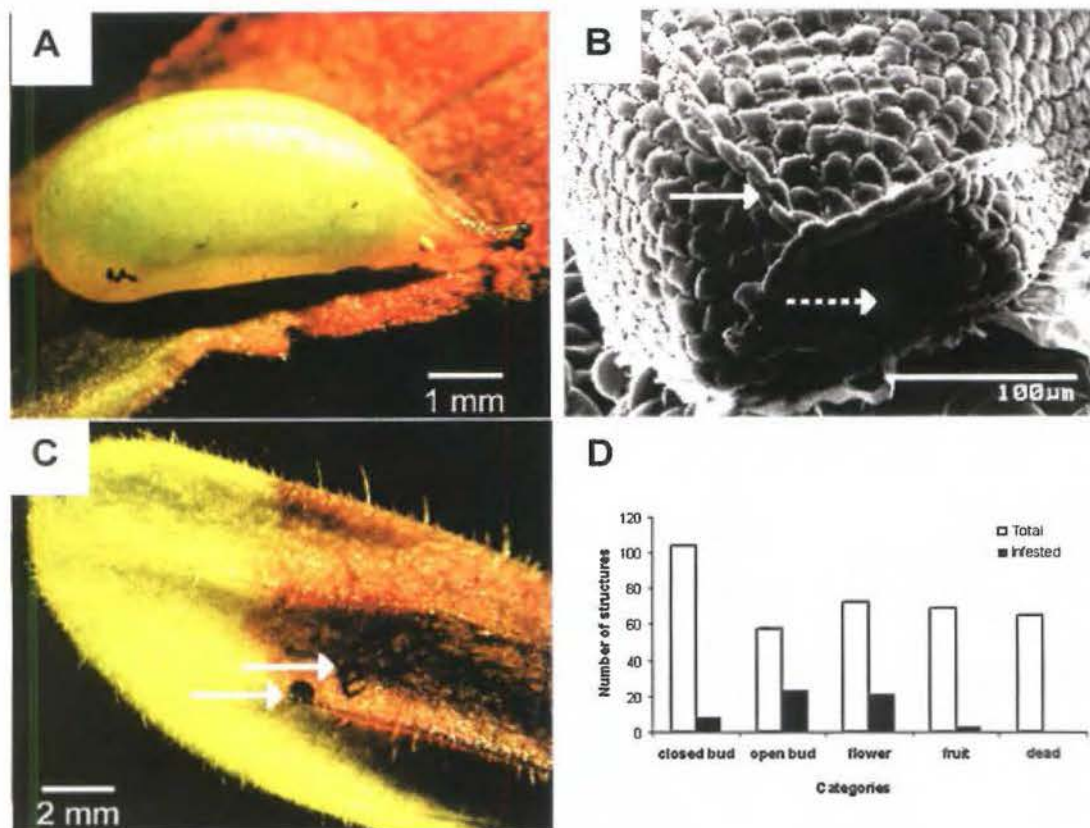
- KAPPELLE, M. (2001): Costa Rica. Pp. 301 - 370. In: M. Kappelle and A. D. Brown (eds.). *Bosques Nublados del Neotrópico*. + 704 pp. Amsterdam & Heredia. Editorial Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).
- MAAS, P. J. M. & WESTRA, L. Y. Th. (1993): *Neotropical Plant Families. A Concise Guide to Families of Vascular Plants in the Neotropics*. + 289 pp. Koenigstein. Koeltz Scientific Books.
- NICHOLSON, S. W. (1994): Pollen feeding in the eucalyptus nectar fly, *Drosophila flavohirta*. - *Physiological Entomology* **19**: 2860.
- NISHIDA, K.; ROTHERAY, G. & THOMPSON, F. C. (2002): First non-predaceous syrphine flower fly (Diptera: Syrphidae): A new leaf-mining *Allograpta* from Costa Rica. - *Studia Dipterologica* **9**: 421 - 436.
- RICHARDSON, C. H. (1915): A contribution to the life history of the corn-feeding syrphus fly (*Mesogramma polita* Say). - *Journal of Economic Entomology* **8**: 338-342
- RILEY, C.V. & HOWARD, L.O. 1888. The corn-feeding syrphus fly. - *Insect Life* **1**: 5-8.
- Roberts, M. J. (1970): The structure of the mouthparts of syrphid larvae (Diptera) in relation to feeding habitats. - *Acta Zoologica* **51**: 43-65; Stockholm.
- ROTHERAY, G. (1988): Morphology and feeding behaviour of the leaf-mining larva of *Cheilosia semifasciata* (Diptera: Syrphidae). - *Journal of Natural History* **22**: 865 - 873.

- ROTHERAY, G. (1993): Colour Guide to Hoverfly Larvae (Diptera, Syrphidae) in Britain and Europe. - *Dipterist Digest* **9**: 156 pp.; Sheffield.
- ROTHERAY, G & GILBERT, F. (1999): Phylogeny of palaeartic Syrphidae (Diptera) evidence from larval stages. – *Zoological Journal of the Linnean Society* **127**: 1 - 112.
- STRAUSS, S. Y. (1997): Floral characters link herbivores, pollinators, and plant fitness. - *Ecology* **78**: 1640 - 1645.
- STRAUSS, S. Y. & ZANGERL, A. R. (2002): Plant - insect interactions in terrestrial ecosystems. Pp. 77 - 106. In: C. M. Herrera and O. Pellmyr (eds.). *Plant - animal interactions. An evolutionary approach.* + 313 pp. Oxford. Blackwell publishing company.
- THOMPSON, F. C.; Thompson B. J. & Fairman, J. E. (2000): Only in Costa Rica: new Neotropical flower flies (Diptera:Syrphidae). - *Studia Dipterologica* **7**: 33 - 43.
- WEISS, M. R. (1996): Pollen-feeding fly alters floral phenotypic gender in *Centropogon solanifolius* (Campanulaceae). - *Biotropica* **28**: 770 - 773.
- WOLF, L. L.; STILES, F. G. & HAINSWORTH, F. R. (1976): Ecological organization of a tropical highland hummingbird community. - *Journal of Animal Ecology* **32**: 349 - 379.

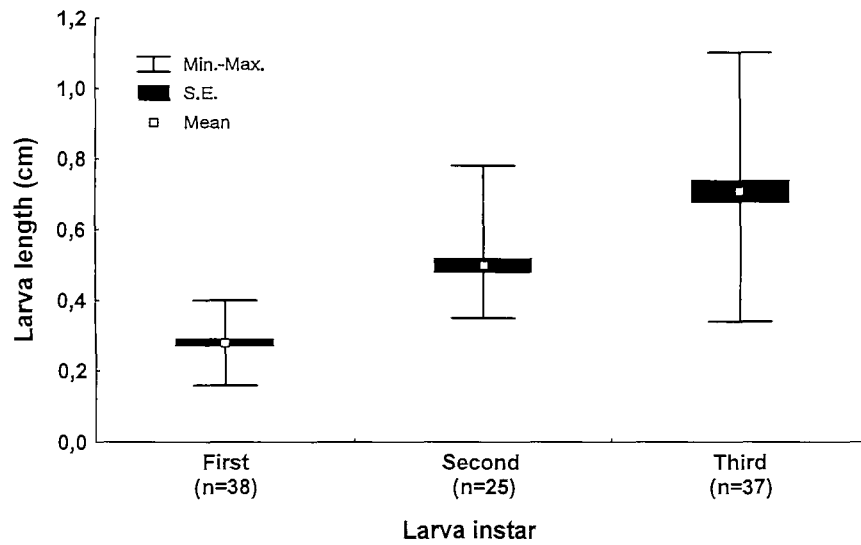
**FIGURES AND TABLES**



**Fig. 1:** Larva features of *Allograpta micrura* (Osten Sacken, 1877) **A.** Orange color pollen mass seen through the yellowish integument of a third instar larva. **B.** A late third instar larva turning green prior to pupation, showing the protruding posterior respiratory process. **C.** Micrograph of the frontal view of the head, showing the antennomaxillary papillae (solid arrow) and the tips of the slightly protruding labium and labrum covered by a solid material (dotted arrow, saliva residue?); scale line = 100  $\mu$ m. **D.** Micrograph of the lateral view of the larva, showing the curved up tip of the labrum and labium. **E.** Micrograph of the fused posterior spiracular process. Arrow with dotted line shows the fleshy base and the arrow with solid line indicates the sclerotized spiracular plate. **F.** Head skeleton, scale line = 0.7mm; upper fig, lateral view, apex to the right; lower fig, ventral view, apex to the right. a = apodeme supporting labrum; dc = dorsal cornu; fl = fleshy lobe encasing mandible; lb = labium; lr = labrum; m = mandible; sa = sclerotised area; t = tentorial arm; vb = ventral bridge (sclerotised strip joining tentorial arms); vc = ventral cornu.

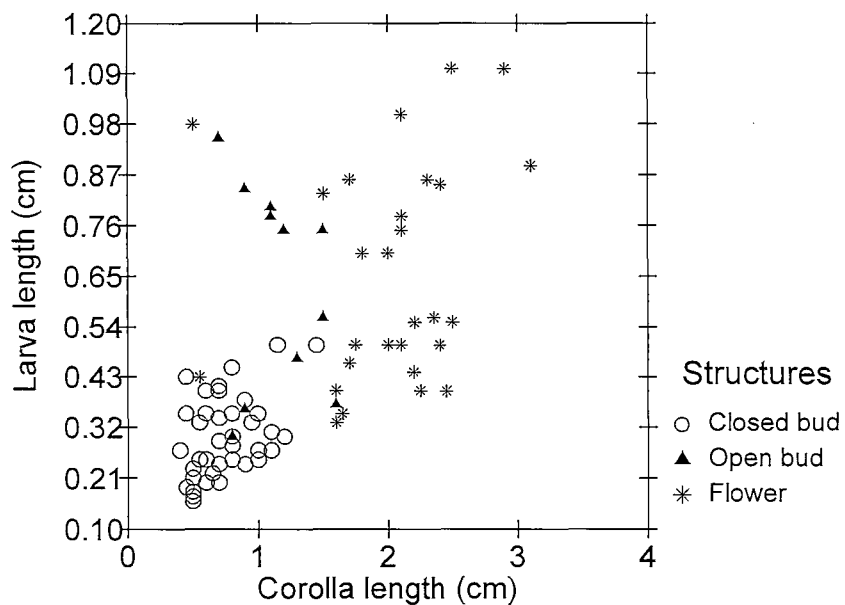


**Fig. 2:** **A.** Recently formed puparium. The heart tube surrounded by white fat cells is visible in the dorsal portion. **B.** One end of the egg showing the scale-like pattern on the surface, the ridge-like structure (solid arrows) and the depression (micropyle?, dotted arrow). **C.** Two holes (arrows) made by larva in a young flower bud of *C. talamancensis*. **D.** Total reproductive structures and the number infested by larvae from 69 racemes of *C. talamancensis*.

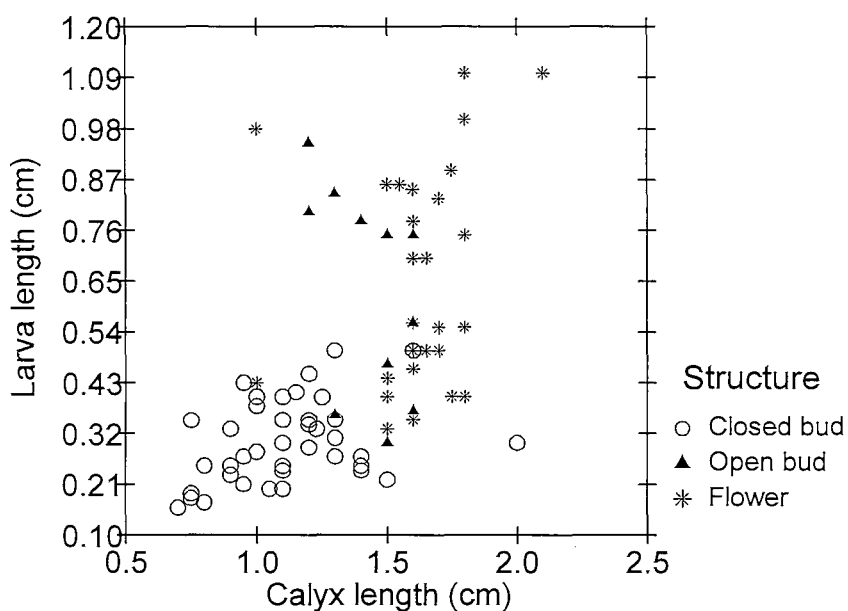


**Fig. 3:** Length of larvae in three instars of *Allograpta micrura* (Osten Sacken, 1877).

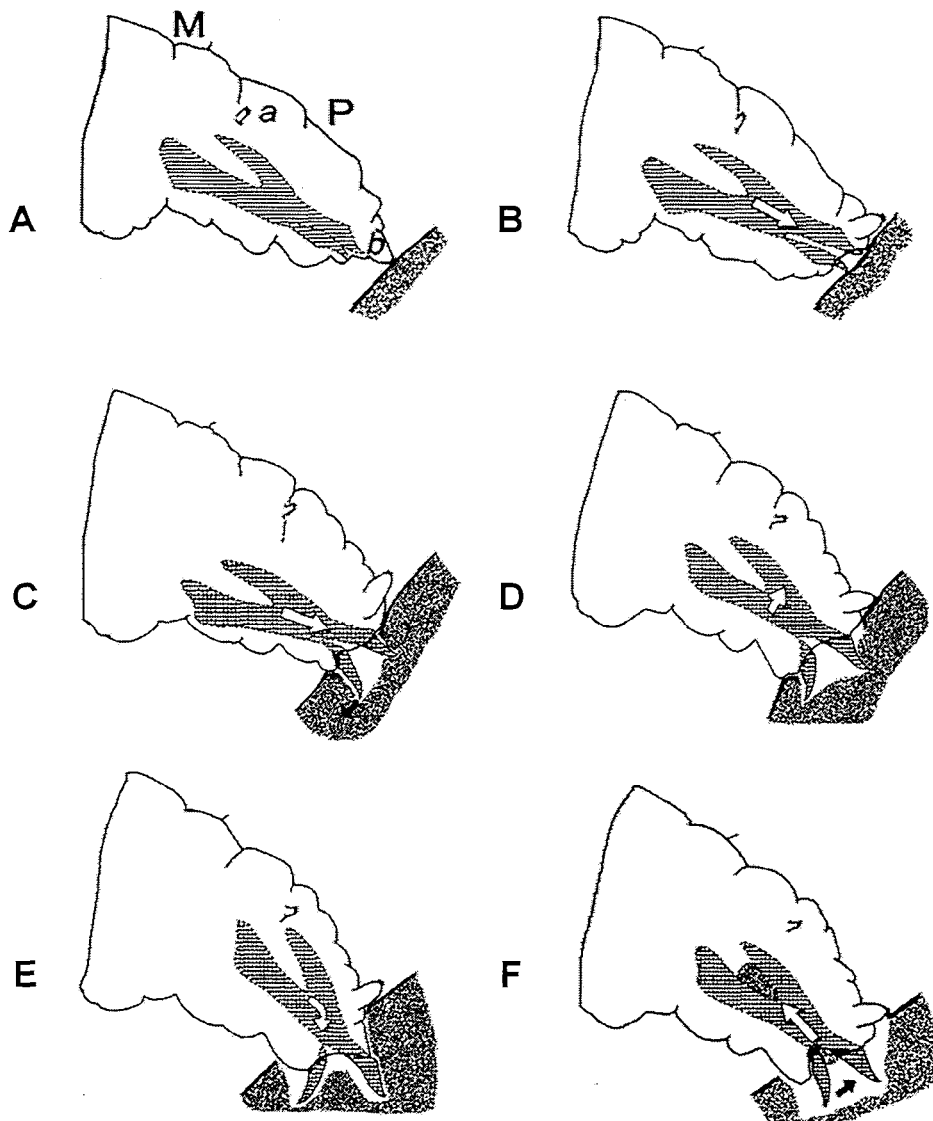




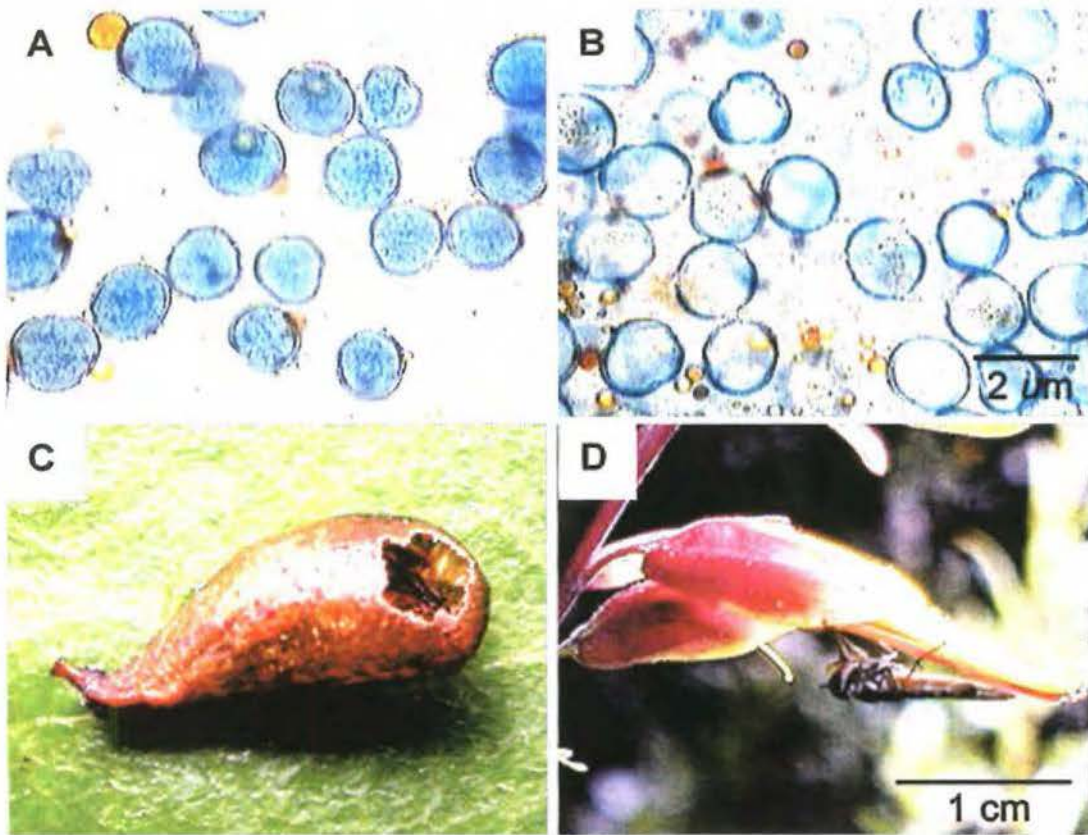
**Fig. 4:** Relation between the length of the larva and the length of the corolla in different floral structures (Adjusted  $r^2 = 0.36$ ,  $n = 80$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Fig. 5:** Relation between the length of the larva and the calyx length in different floral structures (Adjusted  $r^2 = 0.30$ ,  $n = 80$ ,  $p < 0.0001$ ).



**Fig. 6:** Diagram of feeding process in larva of *Allograpta micrura* Osten Sacken, 1877 (motion of head skeleton indicated by white arrows). **A and B:** Pressing mouth parts against the theca and both tips of labrum and labium are protruding against the surface. **C:** Labium and labrum penetrate the theca and further extrusion of the head skeleton was accompanied by flexion of the labium (tip of labium moving away from the labrum), by ventral rotation of the labrum at its apodemes (black arrow). **D:** Head skeleton is lifted dorsally and retracted slightly. **E:** Larva changes angle of head projection and extends the thorax toward the pollen mass, tip of labium moves away from labrum and fill the cavity with pollen. **F:** Tip of labium moves back to labrum (black arrow) and push the pollen pellet into the mouth as the head skeleton retracts. P = prothorax, M = mesothorax, a = anterior spiracle, b = antennomaxillary papillae.



**Fig. 7:** **A – B.** Pollen of *C. talamancensis* dyed blue with lactophenol. **A.** From anther of a fresh flower. **B.** From fresh frass showing a reduced density of dyed material in cytoplasm and rupture of the pollen wall after passing through the gut. (400 X magnification). **C.** Hole chewed in puparium by a parasitoid wasp *Paracaratomus* sp. **D.** Adult feeding on a flower of *C. talamancensis* by extending its proboscis into the corolla tube.

**Table 1.** Similarity of the mean measurements (length, width and high) of puparium between females (n=11) and males (n=7).

	Mean $\pm$ S.D. (mm)		t-value	df	p
	Females	Males			
<b>Length</b>	5.82 $\pm$ 0.51	5.9 $\pm$ 0.19	-0,400	16	0,694079
<b>Width</b>	2.05 $\pm$ 0.28	2.04 $\pm$ 0.18	0,021	16	0,983159
<b>High</b>	2.00 $\pm$ 0.24	1,94 $\pm$ 0.15	0,558	16	0,584402

**Table 2.** Number of infested structures in three flowering categories and its percentage occupied by each instar larvae (n= 80).

instar/structure	closed buds (%)	open buds (%)	flowers (%)	total
<b>1</b>	31 (81.6)	3 (7.9)	4 (10.5)	<b>38</b>
<b>2</b>	9 (36)	2 (8)	14 (56)	<b>25</b>
<b>3</b>	1 (5.9)	6 (35.3)	10 (58.8)	<b>17</b>
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>11</b>	<b>28</b>	

**Table 3.** Mean lengths of larvae, corolla tubes and calyces for larva of different instars in closed buds (n= 41), open buds (n= 11) and flowers (n= 28).

	Larva length (cm)	Corolla length (cm)	Calyx length (cm)
<b>CLOSED BUDS</b>			
INSTARS	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.
1	0.26 ± 0.06	0.71 ± 0.22	1.09 ± 0.28
2	0.43 ± 0.05	0.84 ± 0.31	1.21 ± 0.19
3	0.34	0.70	1.20
<b>OPEN BUDS</b>			
INSTARS	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.
1	0.34 ± 0.04	1.10 ± 0.44	1.47 ± 0.15
2	0.52 ± 0.06	1.40 ± 0.14	1.55 ± 0.07
3	0.81 ± 0.08	1.08 ± 0.27	1.37 ± 0.16
<b>FLOWERS</b>			
INSTARS	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.	Mean ± S.D.
1	0.37 ± 0.04	1.83 ± 0.42	1.60 ± 0.14
2	0.54 ± 0.11	1.99 ± 0.48	1.60 ± 0.19
3	0.92 ± 0.12	2.11 ± 0.75	1.66 ± 0.29

**Author's address**

Ju Lin Weng

Escuela de Biología

Universidad de Costa Rica

2060 San José Costa Rica

E-mail: [julinweng@yahoo.com](mailto:julinweng@yahoo.com)