



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

JÚLIA COLOMBELLI AGOSTINI

EVOLUÇÃO DOS GENES QUE ATUAM NA EXPRESSÃO DO METABOLISMO DE
LIPÍDEOS FLORAIS EM ABELHAS COLETORAS DE ÓLEOS

PROJETO DE DOUTORADO

CURITIBA
2024

1. INTRODUÇÃO

As abelhas fazem parte de um grupo monofilético pertencente à ordem dos Hymenoptera e são caracterizadas por utilizarem néctar e pólen oferecidos por plantas para alimentar a si mesmas e suas larvas (Wcislo & Cane 1996; Michener 2007). São consideradas como importantes organismos que participam de uma relação mutualística para manutenção ecológica, pois são responsáveis pela polinização e dependem exclusivamente dos recursos ofertados pelas angiospermas, com algumas fêmeas possuindo adaptações morfológicas exclusivas para esse comportamento (Thorp 1979; Kremen et al. 2002; Michener 2007). O surgimento desse grupo é estimado entre 100 – 120 milhões de anos atrás, correspondente ao período Cretáceo e atualmente existindo mais de 20.000 espécies de abelhas (Cardinal & Danforth 2013; Ascher & Pickering 2018), podendo ser sociais ou não sociais (solitárias) e 85% delas são consideradas solitárias (Michener 2007).

Os recursos ofertados pelas plantas com flores costumam ser o pólen e néctar, porém existem polinizadores especializados que também possuem o hábito de coletar resina, perfumes e óleo floral para alimentar suas larvas ou até mesmo utilizando como revestimento de células de cria (Neff & Simpson 1981; Michener 2007). Segundo filogenias moleculares, a origem de produção de óleos florais nas plantas foi independente em diversas linhagens de angiospermas, com estruturas florais diversificadas, porém todas as plantas que produzem esses lipídeos possuem uma glândula secretora, denominada elaióforo, que pode ser separada por dois tipos distintos, epitelial e tricômático, sendo associada a modificações nas estruturas morfológicas das abelhas especializadas na coleta desses óleos (Vogel 1974, 1989; Renner & Schaefer 2010).

O comportamento de coleta de óleos florais é exclusivo para o grupo das abelhas, com surgimento independente e presente em apenas 500 espécies de abelhas com estruturas especializadas que auxiliam na coleta, manuseio e transporte dos lipídeos provenientes dos recursos florais. Essas estruturas modificadas, geralmente com maior incidência em fêmeas, são compostas por variações na forma, tamanho de alguns segmentos e pilosidades das pernas ou esternos (Vogel 1974; Neff & Simpson 1981; Roig-Alsina 1997; Cocucci et al. 2000; Michener 2007; Renner & Schaefer 2010). As abelhas que apresentam a especialização para coleta de lipídeos florais são representadas por sete tribos Centridini, Epicharitini, Tapinotaspidini, Tetrapediini, Ctenoplectrini, Macropidini e Redivivini, sendo as quatro primeiras exclusivas do Novo Mundo e em grande maioria na região Neotropical, Ctenoplectrini dispersa pela região Paleotropical e sudeste asiático, Macropidini e Redivivini presentes na região Holártica e Afrotropical (Roig-Alsina & Michener 1993; Alves dos Santos et al. 2007). Na região Neotropical, esse comportamento é visto em apenas quatro tribos:

Centridini, Epicharitini, Tapinotaspidini e Tetrapediini (Martins et al. 2014; Moure & Melo 2022).

Todas as abelhas coletoras de óleo são solitárias (Michener 2007). A tribo Centridini era considerada polifilética de acordo com caracteres morfológicos (Roig-Alsina & Michener 1993) e moleculares (Straka & Bogusch 2007), sendo composta pelos gêneros *Centris* e *Epicharis*, representada por 21 subgêneros, com aproximadamente 250 espécies, compondo o maior grupo das abelhas coletoras de lipídeos florais e com presença do elaióspato, que consiste no aparato coletor de óleo presente nas pernas anteriores e médias com pentes basitarsais (padrão four-legged) (Neff & Simpson 1981; Moure et al. 2012). Entretanto, uma revisão feita por Martins et al. (2014) através de dados moleculares propõem a separação de *Epicharis* e *Centris*, sendo que dentro da linhagem 'apine', *Centris* é grupo irmão das abelhas corbiculadas, *Epicharis* grupo irmão de ambos e *Tetrapedia* como grupo irmão de *Ctenoplectra*. As espécies de Tapinotaspidini uma vez já foram pertencentes a Exomalopsini e posteriormente separadas por Roig-Alsina & Michener (1993) e Moure (1994). Atualmente, Tapinotaspidini é constituída por 14 gêneros os quais juntos reúnem 144 espécies descritas (Aguiar 2022) representando o grupo mais diverso em termos das adaptações morfológicas para coleta de óleo (Roig-Alsina 1997, Coccuci et al. 2000). A tribo Tetrapediini possui apenas um gênero com 28 espécies e 22 delas com ocorrência no Brasil (Moure & Melo 2022).

O óleo floral costuma ser misturado ao pólen para substituir o néctar no alimento larval, possuindo cerca de oito vezes mais calorias e é produzido por cerca de 2000 espécies em 11 famílias de angiospermas. Malpighiaceae é composta por 60 gêneros reconhecidos, sendo 47 são exclusivamente neotropicais e apenas espécies da região neotropical possuem glândulas de óleo funcionais (Anderson 1979, 1990; Vogel 1974, 1990). Os lipídeos florais são considerados não voláteis, podendo ser incolor ou amarelado, inodoros e apresentando uma certa viscosidade (Buchmann 1987). Consistem em ácidos graxos livres, glicerídeos com ácidos graxos livres, mono ou diglicerídeos e di- e triacilglicerol (Vogel 1974; Simpson et al. 1977, 1979, Seigler et al. 1978; Reis et al. 2000).

O corpo gorduroso nos insetos é um órgão central para o metabolismo de lipídeos (Arrese & Soulages 2010) e é considerado análogo ao tecido adiposo e fígado em vertebrados (Hoshizaki 2005). Ele é composto por trofócitos que preenchem a cavidade abdominal de insetos, incluindo as abelhas. Também apresenta outros tipos de células, inclusive os adipócitos e os enócitos que estão intimamente relacionadas ao metabolismo lipídico. O início do metabolismo lipídico se dá com a hidrólise dos lipídios da dieta, na qual ocorre a absorção de monômeros lipídicos. Após esse processo, ocorre o transporte de lipídios do intestino médio

para o corpo gorduroso e transporte de lipídios do corpo gorduroso para outros locais que demandam energia (Chapman 1998; Toprak et al. 2020). Sua função na fase larval é acumular reservas de lipídeos e outros componentes que serão utilizados posteriormente para obtenção de energia no processo de metamorfose (Cruz-Landim 2009).

Os lipídeos podem ser considerados a mais importante fonte de energia para insetos, pois além de auxiliar nos processos de crescimento e desenvolvimento, também atuam em complexos mecanismos fenotípicos, como voo, migração, diapausa, nutrição do embrião, síntese de feromônios sexuais, desenvolvimento dos ovócitos e secreções defensivas (Klowden 2013). Não há registros de que os lipídeos dos recursos florais façam parte do hábito alimentar de abelhas adultas coletoras de óleos, entretanto sabe-se que o néctar e o pólen também oferecem esse composto, porém em quantidades ínfimas (Willmer 2011; Agostini et al. 2014). Os lipídeos estão presentes em vários tecidos dos insetos. São derivados da dieta larval, sendo digeridos, convertidos em diacilglicerol, exportados para a hemolinfa juntamente com as apolipoproteínas e entregue aos trofócitos do corpo gorduroso na forma de triacilglicerol (Liu et al. 2009).

Muito do que se sabe sobre as vias do metabolismo lipídico em insetos tem sido geralmente investigada com estudos feitos com a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* e quase sempre associado à diapausa (Canavoso et al., 2001; Arrese et al., 2010; Reynolds et al., 2012; Gondim et al., 2018). Entretanto, os insetos no geral possuem diferentes estilos de vida e os resultados obtidos por esses estudos podem não ser representativos (Majerowicz & Godim 2013). Sendo assim, as informações de estudos moleculares sobre os genes envolvidos no metabolismo lipídico atuantes nas vias do metabolismo lipídico em Hymenoptera são muito limitadas e carecem trabalhos que elucidem questionamentos da área.

A expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico de insetos costuma ser regulada através de uma ampla variedade de fatores de transcrição que são condicionados de diferentes maneiras. Grande parte dos trabalhos associados ao metabolismo de lipídeos de insetos costumam analisar os genes acetil-CoA carboxilase (*acc*), síntese de ácido graxo (*fas*), lipase (*lip*) e acil-CoA desidrogenase (*acd*) (Sim & Delinger 2009; Gianetto et al. 2020), que serão os genes alvos de estudo associados ao comportamento de coleta de óleos florais em abelhas.

2. JUSTIFICATIVA

No banco de dados “National Center of Biotechnology Information” (NCBI) estão depositados 98 genomas da ordem de Hymenoptera, oito gêneros de abelhas solitárias e apenas

um genoma de *Ctenoplectra terminalis* representando as abelhas coletoras de óleos (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Apesar do número de trabalhos com genomas de insetos ter tido um aumento significativo nos últimos anos, os estudos com as espécies solitárias são bastante incipientes, e se faz necessário não só para compreensão do surgimento da socialidade (Elias-Neto et al. 2014). Abelhas solitárias são conhecidas por serem coletoras de óleo, fácil de serem estudadas através dos ninhos-armadilha, pois tem grande abundância numérica (Alves dos Santos et al. 2007) e por representarem cerca de 85% das espécies de todas as abelhas no mundo (Michener 2007).

• **Relevância para a linha de pesquisa**

Os avanços na tecnologia de sequenciamento de nova geração permitem a realização de estudos que esclarecem certas complexidades fenotípicas (Kocher et al. 2013; Santos et al. 2018). Através dessa metodologia, é possível observar a organização do material genético, os genes específicos envolvidos e sua abundância, aquisição de novos genes e manipulação, auxiliando de forma direta os estudos evolutivos (Ellegren 2014).

Nos insetos em geral, é possível observar o mesmo cenário com relação ao aumento de trabalhos nas áreas de fisiologia, composição química e molecular de lipídeos. Entretanto, existe a importância de destacar que essas questões permanecem não elucidadas em diversas espécies ou até mesmo desconhecidas. Sendo assim, entender como esses processos funcionam, a nível transcricional, correspondem a desafios futuros para a análise do metabolismo lipídico em insetos (Atella et al. 2012).

• **Relevância econômica-social**

Estudos como esse se mostram de extrema importância para entender a sobrevivência, ciclos de vida e aptidão dos organismos estudados, além de aprofundar o conhecimento da temática do comportamento das abelhas coletoras de óleos florais, bem como o estudo do metabolismo desse componente tão importante na dieta de insetos, considerado fundamentalmente relevante para a sobrevivência e saúde dos polinizadores (Durant et al. 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal desse projeto é aprofundar os conhecimentos dos mecanismos moleculares envolvidos no metabolismo de lipídeos dentro do grupo das abelhas coletoras de óleos florais.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre o metabolismo de lipídeos em insetos, com foco em abelhas.
- Gerar o genoma de pelo menos uma espécie dos gêneros *Centris*, *Epicharis*, *Lanthanomelissa* e *Tetrapedia* e analisá-los sobre o contexto dos mecanismos evolutivos do metabolismo de lipídeos.
- Caracterizar os genes que atuam nas vias metabólicas de lipídeos no grupo das abelhas coletoras de óleos florais.
- Comparar os genes diferencialmente expressos que atuam nas vias metabólicas de lipídeos entre larvas e adultos.
- Analisar e comparar a expressão dos genes entre abelhas que exibem o comportamento de coleta de óleos florais com as espécies de abelhas que continuam a utilizar apenas pólen e néctar como fonte de alimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico, armazenamento e dissecação

As abelhas adultas representantes dos gêneros *Centris*, *Epicharis*, *Lanthanomelissa* e *Tetrapedia* utilizadas nesse projeto serão obtidas por coleta ativa. Já os espécimes de diferentes estágios de desenvolvimento, serão coletados através de ninhos-armadilhas confeccionados com tubo de cartolina preta e gomos de bambu. Os ninhos serão monitorados e aqueles com maior número de células serão coletados. Quando possível, as fêmeas também serão coletadas juntamente com o ninho construído. Os imaturos (ovos, larvas e pupas) serão colocados em placas de cultura de 96 poços sobre o conteúdo polínico encontrado na célula e mantidos em estufa com temperatura à 30°C e umidade relativa por volta dos 70%. Os ovos ou imaturos, como larvas e pupas serão separados e removidos para análise molecular de acordo com o estágio de desenvolvimento. Cada indivíduo será pesado para se ter um controle sobre o estágio em que cada amostra se encontrava. Após separação, os indivíduos serão mantidos a -80° C. Os indivíduos serão dissecados e terão seus corpos gordurosos retirados, homogêneos e armazenados. O material dissecado será estocado em reagente TRIzol (Invitrogen) para posterior purificação do RNA total e DNA. No estágio de pupa, o material dissecado do abdômen também será armazenado em TRIzol. O mesmo procedimento será realizado na fase de ovo. Após o armazenamento, todas as amostras serão congeladas a -80° C até o momento da extração do RNA total. Cada amostra corresponderá a apenas um indivíduo.

4.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e sequenciamento

Para selecionar os genes relacionados a via do metabolismo lipídico será utilizada a base de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). As sequências de referências dos genes codificantes de acetil-CoA carboxilase (*acc*), ácido graxo sintase (*fas*), lipase (*lip*) e acil-CoA desidrogenase (*acd*) serão obtidas através das sequências homólogas dos trabalhos depositados em banco de dados moleculares. As identidades das sequências também serão confirmadas pela realização de BLASTN pesquisas no NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

A obtenção do material genético será feito através da extração total do RNA coletado em amostragens recentes, por meio da obtenção do tecido de interesse, seguindo um protocolo que se utiliza de beads magnéticas. Será feita a síntese de cDNA (complementar ao mRNA) a partir da transcrição reversa do RNA total extraído. Os resultados da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) serão avaliados através da técnica de Eletroforese em Gel de Agarose, para analisar se o produto foi gerado com sucesso e, posteriormente, todas as bibliotecas serão purificadas e enviadas para sequenciamento (método *Next Generation Sequencing*).

4.3 Análise in silico

As sequências de genes obtidas (*acc*, *lip*, *fas* e *acd*) terão sua qualidade avaliada e serão submetidas ao GenBank. As sequências de nucleotídeos serão traduzidas em aminoácidos, editadas, passarão por alinhamentos múltiplos e serão analisadas em softwares especializados, para que assim sejam realizados os cálculos e construção de árvores filogenéticas baseadas nos genes que atuam no metabolismo de lipídeos nas espécies de abelhas coletoras de óleos florais. Os grupos externos serão adicionados de acordo com disponibilidade de informações do banco de dados moleculares. Com as amostras de cDNA serão determinados os níveis de transcrição dos genes relacionados ao metabolismo lipídeos (*acc*, *fas*, *lip* e *acd*) e as medidas de expressão dos genes serão normatizadas através de um gene de referência adequado.

4.4 Caracterização da expressão dos genes *acc*, *fas*, *lip* e *acd*

Após sequenciamento, as sequências serão analisadas para a caracterização dos genes, quanto ao seu tamanho, quantidade de éxons e íntrons, e tamanho do open reading frame (ORF) e sequência de aminoácidos da proteína predita. Será feita a comparação da expressão gênica de *acc*, *fas*, *lip* e *acd* que ocorre entre o desenvolvimento dos estágios de vida das espécies de abelhas que possuem o comportamento de coleta de óleos, a fim de entender como essa expressão funciona em cada fase, visto que a quantidade de lipídeos consumidos varia durante

a vida dessas abelhas. Paralelamente, também será comparada a expressão desses genes em espécies de abelhas que não coletam óleos florais. Através dessas análises será possível entender o funcionamento e a evolução dos genes relacionados ao metabolismo de lipídeos no grupo das abelhas coletoras de óleos.

5. ORÇAMENTO

Tabela 1. Previsão orçamentária para o projeto.

Atividade	Despesas	Valor estimado
Obtenção de dados moleculares	Reagentes para a extração, PCR, eletroforese e sequenciamento	R\$ 20000
Coletas	Transporte	R\$2000
Total	Atividades totais	R\$22000*

*Todos os recursos financeiros para a elaboração do projeto serão custeados pelo Laboratório de Biologia Comparada de Hymenoptera, bem como por eventuais auxílios obtidos diretamente junto ao Programa de Entomologia.

6. CRONOGRAMA

Atividades	2023		2024		2025		2026		2027
	Semestre		Semestre		Semestre		Semestre		Semestre
	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	
Cumprimento dos créditos pelo Programa de Pós-graduação em Entomologia									
Ajustes no projeto e metodologia									
Revisão bibliográfica									
Coleta de material biológico, dissecação e armazenamento									
Análise moleculares e in sílico									
Elaboração de manuscrito para publicação									
Qualificação									
Redação da tese									
Defesa									

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-dos-Santos, I., Machado, I.C., Gaglianone, M.C. (2007) História natural das abelhas coletoras de óleo. *Oecologia Bras.* 11, 554–557.
- Anderson, W.R. (1979) Floral conservation in neotropical Malpighiaceae. *Biotropica*, 11(2): 219-223.
- Anderson, W.R. (1990) The origin of the Malpighiaceae - The evidence from morphology. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 64: 210-224.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L. (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207-225.
- Ascher, J.S., Pickering J. (2018) Discover life: bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea).
- Buchmann, S.L. (1987) The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 343-369.
- Cardinal, S., Danforth, B.N. (2013) Bees diversified in the age of eudicots. *Proc. R. Soc. B*: 280, 1–9.
- Chapman, R. F. (1998). *The Insects: Structure and function* (4th ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Coccuci, A.A., Séric A., Roig-Alsina, A. (2000) Oilcollecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function and probable origin. *Mitt. Münch. Entomolog. Ges.* 90, 51–74.
- Cruz-Landim, C. (2009) *Abelhas: morfologia e função de sistemas*. São Paulo: Editora Unesp. 407 p.
- Durant, D.R., Berens, A.J., Toth, A.L. et al. Transcriptional profiling of overwintering gene expression in the small carpenter bee, *Ceratina calcarata*. *Apidologie* 47, 572–582 (2016).
- Elias-Neto, M., Nascimento, A.L.O., Bonetti, A.M. et al. (2014) Heterochrony of cuticular differentiation in eusocial corbiculate bees. *Apidologie*. 45: 397.
- Ellegren, H. (2014) Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. *Trends in ecology & evolution*. 29 (1): 51-63.
- Giannetto, A., Oliva, S., Lanes, C. F. C., de Araújo Pedron, F., Savastano, D., Baviera, C., ... & Fasulo, S. (2020). *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae and prepupae: biomass production, fatty acid profile and expression of key genes involved in lipid metabolism. *Journal of Biotechnology*. 307, 44-54.
- Hoshizaki, D. K. (2005). Fat-cell development. In L. I. Gilbert, K. Iatrou & S. Gill (Eds.), *Complete molecular insect science* pp. 315–345.
- Klowden, M. J. (2013) *Physiological systems in insects* (third edition). Elsevier.
- Kremen, C., Williams, N.M., Thorp, R.W. (2002) Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:16812–6.
- Liu, Y., Liu H.H., Liu, S.M., Wang S., Jiang R.J., Li S. (2009) Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Arch Insect Biochem.* 71(1):16-30.
- Martins, A.C., Melo, G.A.R., Renner, S.S. (2014) The corbiculate bees arose from New World oil-collecting bees: Implications for the origin of pollen baskets. *Mol. Phylogenet. Evol.* 80, 88–94.
- Michener, C.D. (2007) *The bees of the world*. Baltimore, Maryland, USA: *The John Hopkins University Press*.
- Moure, J. S. & Melo, G. A. R. (2022) Tetrapediini Michener & Moure, 1957. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the*

- Neotropical Region - online version. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Jul/16/2023
- Moure, J.S. (1994) Lissopedia, gen.n. de Paratetrapediini para a região Neotropical, com as descrições de três espécies novas (Apoidea, Anthophoridae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 9:305-317.
- Neff, J.L. & Simpson, B.B. (1981) Oil-collecting structures in the Anthophoridae: Morphology, function and use in systematics. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 54: 95-123.
- Reis, M.G., Faria, A.D., Bitt Rich, V., Amaral, M.C.E. & Marsaioli, A.J. (2000) The chemistry of flower rewards- *Oncidium* (Orchidaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11: 600-608.
- Renner, S.S., Schaefer, H. (2010) The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365:423–35.
- Roig-Alsina, A. & Michener, C.D. (1993) Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). *University of Kansas Science Bulletin*, 55: 123-173.
- Roig-Alsina, A. (1997) A generic study of the bees of the tribe Tapinotaspidini, with notes on the evolution of their oil-collecting structures. *Mitteilungen Muenchener Entomologischen Gesellschaft*, 87: 3-21.
- Santos, P.K.F., de Souza Araujo, N., Françoso, E. et al. (2018) Diapause in a tropical oil-collecting bee: molecular basis unveiled by RNA-Seq. *BMC Genomics*. 19, 305.
- Seigler, D., Simpson, B.B., Martin, C. & Neff, J.L. (1978) Free 3-acetoxylfatty acids in floral glands of *Krameria* species. *Phytochemistry*, 17, 995-996.
- Sim, C., Denlinger, D.L. (2009) Transcription profiling and regulation of fat metabolism genes in diapausing adults of the mosquito *Culex pipiens*. *Physiol. Genomics*. 39, 202–209.
- Simpson, B.B., Neff, J.L. & Seigler, D. (1977) *Krameria*, free fatty acids and oil-collecting bees. *Nature*, 267, 150-151.
- Simpson, B.B., Seigler, D.S. & Neff, J.L. (1979) Lipids from the floral glands of *Krameria*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 7, 193-194.
- Straka, J., Bogusch, P. (2007) Phylogeny of the bees of the family Apidae based on larval characters with focus on the origin of cleptoparasitism (Hymenoptera: Apiformes). *Syst. Entomol*, 32:700–711.
- Thorp, R.W. (1979) Structural, behavioral, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 66:788–812.
- Vogel, S. (1974) Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Trop. und Subtrop. Pflanzenwelt* 7, 1–267.
- Vogel, S. (1989) Fettes Öl als Lockmittel. Erforschung der Ölbietenden Blumen und ihrer Bestäuber. Pp 113-130. Akademie der Wissenschaften und der Literatur Mainz - 1949-1989. *Franz Steiner Verlag*. 611pp.
- Vogel, S. (1990) History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 55: 130-142.
- Weislo, W.T., Cane J.H. (1996) Floral resource utilization by solitary bees (Hymenoptera: Apoidea) and exploitation of their stored foods by natural enemies. *Annu. Rev. Entomol.* 41:257–86.
- Willmer, P. (2011) *Pollination and Floral Ecology*. New Jersey, Princeton University Press.