

IOLANDO BRITO FAGUNDES

**INFLUÊNCIA DO *STATUS* COMPORTAMENTAL DAS OPERÁRIAS SOBRE
O PERÍODO DE PRÉ-OVIPOSIÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE RAINHAS DE
Melipona quadrifasciata Lep. (HYMENOPTERA: MELIPONINI)
EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006**

IOLANDO BRITO FAGUNDES

**INFLUÊNCIA DO *STATUS* COMPORTAMENTAL DAS OPERÁRIAS SOBRE
O PERÍODO DE PRÉ-OVIPOSIÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE RAINHAS DE
Melipona quadrifasciata Lep. (HYMENOPTERA: MELIPONINI)
EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 31 de março de 2006.



Prof. José Eduardo Serrão
(Conselheiro)



Profa. Mara Garcia Tavares



Profa. Georgina Maria Faria Mucci



Profa. Raquel Perez Maluf



Prof. Lúcio Antonio de O. Campos
(Orientador)

Ao meu Pai Joaquim, que em forma de matéria persiste em seres vivos e inanimados e, em forma de espírito, povoa a minha memória com os mais belos exemplos de honestidade e retidão de caráter (*In memoriam*)

À minha mãe Dinorá, sem ela a palavra amor seria apenas uma palavra, com ela, é essência manifesta.

À minha companheira Fátima e meus filhos Kalil e Tainã, extensões da minha própria existência, através deles torno-me eterno.

AGRADECIMENTOS

- Minha permanência no Programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa foi propiciada pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, a quem agradeço esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional.
- Agradeço ao Professor Doutor Lúcio Campos, que gentilmente, aceitou o desafio de orientar um tipo teimoso e determinado como eu. Sua forma de atuar como orientador propiciou-me buscar as soluções para os problemas de forma segura e independente.
- Ao professor Serrão, que além de conselheiro mostrou-se amigo e fraterno, colaborando comigo em todos os momentos em que precisei, demonstrando o desprendimento que só as pessoas de mais elevado caráter possuem.
- Aos técnicos do Apiário, Ferreira, Íris, Osmar, Toninho Alves, Toninho e Cabrito, que além de uma boa prosa mineira, me auxiliaram no que podiam. Muito do que concretizei não seria possível sem vocês.
- Aos professores Djair e Alfredo que, além dos diálogos divertidos e teóricos, cederam seus sítios para que eu montasse parte dos meus experimentos.
- Ao Pallini, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da UFV, que além de sua competência, mostrou-se solidário às reivindicações do corpo discente.
- À Paula, secretária da Pós-graduação em Entomologia– UFV, pela eficiência, incentivo e simpatia.
- Aos professores Og, Flávia e Sperberber pelos momentos de convivência enriquecedora e divertida, demonstrando mais uma vez, que é preciso ter prazer em conhecer.
- Aos Professores Arne Janssen (University of Amsterdam), Zé Henrique (UFV), Marcos Pinho (UESB) e a colega Maria por terem me ajudado com as análises estatísticas.
- Aos meus irmãos de caminhada, Flavio, Adolfo, Charles e Pedro, que juntos, compartilhamos alegrias, saudades e angústias, sem nunca perder de vista os nossos objetivos.
- Ao Pró-Reitor de Extensão da UESB, Professor Paulo Sérgio, que me estimulou a pesquisar abelhas, fornecendo-me os primeiros livros e artigos.
- Aos funcionários técnicos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pelas palavras de incentivo, que me ajudaram a encarar este desafio e perseverar.
- À minha mãe Dinorá e meu pai Joaquim (presente em memória), que me propiciaram a base de todo o saber, pelo apoio espiritual e imenso amor que me doaram, agradecimento que estendo aos meus queridos irmãos, sobrinhos e demais familiares.
- À minha companheira, amiga e mãe de meus filhos, Fátima, pelo apoio recebido no momento de optar por esse desafio, e acima de tudo, pela paciência com que suportou os momentos de tensão e renúncias em razão desse projeto.
- Aos meus filhos, Kalil e Tainã, que apesar da tenra idade, aceitaram as mudanças ocorridas em suas e compreenderam o quanto era importante para eu alcançar este objetivo.
- A todos os professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da UFV com quem tive a felicidade de relacionar-me, e a todas aquelas pessoas e instituições, que embora não mencionadas, contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste projeto.

“Entendemos que a sorte não é uma divindade, como a maioria das pessoas acredita - pois um deus não faz nada ao acaso – nem algo incerto, o sábio não crê que ela proporcione aos homens nenhum bem ou nenhum mal que sejam fundamentais para uma vida feliz, mas, sim, dela pode surgir o início de grandes bens e de grandes males. A seu ver, é preferível ser desafortunado e sábio, a ser afortunado e tolo; na prática, é melhor que um bom projeto não chegue a bom termo do que chegue a ter êxito um projeto mau.”

(Epicuro – Carta sobre a Felicidade)

CONTEÚDO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.4. Objetivos.....	6
2. CAPÍTULO I: Influência do status comportamental de operárias de diferentes origens sobre o processo de reconhecimento e comportamento defensivo de <i>Melipona quadrifasciata</i> Lep. (HYMENOPTERA: MELIPONINI).....	7
2.1. INTRODUÇÃO.....	8
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.2.1. Coleta das abelhas para os ensaios.....	12
2.2.2. Bioensaios.....	13
2.2.3. Iniciativa de agressão.....	13
2.2.4. Número de lutas com o tempo.....	14
2.2.5. Ocorrência de injúrias.....	15
2.3. RESULTADOS.....	16
2.3.1. Iniciativa de agressão.....	16
2.3.2. Número de lutas com o tempo.....	19
2.3.3. Ocorrência de injúrias.....	22
2.4. DISCUSSÃO.....	24
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
3. CAPÍTULO II: Influência da idade de rainhas virgens e do status comportamental das operárias no processo de aceitação de rainhas em <i>Melipona quadrifasciata</i> Lep. (Hymenoptera: Meliponini):.....	37

3.1. INTRODUÇÃO.....	38
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.2.1. Coleta de rainhas para os ensaios.....	41
3.2.2. Coleta de operárias e montagem de mini-colônias.....	41
3.2.3. Bioensaios de aceitação de rainhas virgens.....	42
3.3. RESULTADOS.....	43
3.3.1. Descrição das interações entre operárias e rainha durante a introdução de rainhas virgens.....	46
3.4. DISCUSSÃO.....	48
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
4. CAPITULO III: Influência status comportamental das operárias sobre o período de pré-oviposição e sobrevivência de rainhas de <i>Melipona quadrifasciata</i> Lep. (Hymenoptera: Meliponini) em condições de laboratório.....	55
4.1. INTRODUÇÃO.....	56
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.2.1. Obtenção das abelhas.....	60
4.2.2. Formação de mini-colônias e introdução de rainhas recém copulada	61
4.2.3. Cópula em condições de laboratório.....	62
4.2.4. Manejo e coleta de dados.....	63
4.3. RESULTADOS.....	65
4.3.1. Descrição das interações operárias–rainha e atividades de construção de elementos do ninho.....	66
4.4. DISCUSSÃO.....	73
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	82
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

RESUMO

FAGUNDES, Iolando Brito. D. S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2006.
Influência do *status* comportamental das operárias sobre o período de pré-oviposição e sobrevivência de rainhas de *Melipona quadrifasciata* Lep. (HYMENOPTERA: MELIPONINI) em condições de laboratório. Orientador: Lúcio Antonio de Oliveira Campos. Conselheiros: José Eduardo Serrão e José Henrique Schoereder.

No presente trabalho objetivou-se, a) investigar a influência do *status* comportamental de operárias de diferentes origens no processo de reconhecimento e comportamento defensivo; b) a influência da idade das rainhas e do *status* comportamental das operárias no processo de aceitação de rainhas virgens; c) influência do *status* comportamental das operárias sobre a sobrevivência e período de pré-oviposição de rainhas de *M. quadrifasciata* em condições de laboratório. No primeiro capítulo foram realizados três ensaios (iniciativa de agressão, número de lutas com o tempo e ocorrência de injúrias), onde grupos de operárias de diferentes origens e *status* comportamental foram confrontados numa arena neutra. Na situação controle, não ocorreu qualquer interação agressiva entre os grupos confrontados. Os resultados verificados para o grupo experimental indicam que o *status* comportamental e o grau de experiência das operárias modulam o tipo de resposta agressiva a co-específicos não familiares. Encontros realizados entre grupos de operárias forrageiras com operárias forrageiras e de operárias forrageiras com nutridoras, resultaram em agressividade mútua e elevado número de indivíduos injuriados. Resultado contrário ao encontrado para operárias recém-emergidas, que, embora tenham iniciado alguns confrontos com operárias forrageiras ou nutridoras, estes nunca resultaram em contra-ataques, e conseqüentemente, em operárias injuriadas. Encontros entre grupos de operárias nutridoras com nutridoras e de operárias nutridoras com recém-emergidas não resultaram em manifestações agressivas perceptíveis. No segundo capítulo desta tese, rainhas virgens de zero a três dias de idade foram marcadas e introduzidas em mini-colônias formadas por populações de operárias nutridoras ou forrageiras. Verificou-se que a rejeição de rainhas por operárias forrageiras aumenta com a idade das rainhas, sendo as rainhas recém-emergidas de zero dia de idade as mais toleradas. Já nos encontros com operárias nutridoras, a maioria das rainhas virgens foi aceita

independentemente da idade. Estes resultados indicam que operárias forrageiras e nutridoras de *M. quadrifasciata* reagem de forma diferenciada à presença de rainhas virgens. No terceiro capítulo, rainhas copuladas em condições de laboratório foram introduzidas em mini-colônias constituídas por operárias forrageiras, nutridoras, recém-emergidas e população mista. Verificou-se que a idade das operárias influencia o tempo de pré-oviposição e sobrevivência de rainhas de *M. quadrifasciata* em condições de laboratório. Os resultados indicam que, em colônias constituídas por operárias nutridoras ou população mista, a mortalidade foi baixa, o número de rainhas em postura foi elevado e o período de pré-oviposição foi reduzido. Em colônias constituídas por operárias recém-emergidas, houve elevada mortalidade, postura tardia e reduzida porcentagem de rainhas em postura. Em colônias formadas por operárias forrageiras não ocorreu postura e todas as rainhas morreram.

ABSTRACT

FAGUNDES, Iolando Brito, D.S. Universidade Federal de Viçosa, march, 2006.
Influence of the workers' bee behavioral status on the preoviposition period and survival of queens of *Melipona quadrifasciata* Lep. (HYMENOPTERA: MELIPONINI) in laboratory conditions. Adviser: Lúcio Antonio de Oliveira Campos. Committee members: José Eduardo Serrão and José Henrique Schoederer.

In this work it was aimed at a) to investigate the influence of the workers' bee behavioral *status* of different origins in the recognition process and defensive behavior; b) the influence of the age of the queens and of the workers' bee behavioral *status* in the acceptance process of virgin queens; c) influence of the workers' bee behavioral *status* on the survival and preoviposition period of queens of *M. quadrifasciata* in laboratory conditions. In the first chapter three trials were accomplished (aggression initiative, number of fights with the time and occurrence of injuries), where workers bee of different origins groups and behavioral *status* were confronted in a neutral arena. In the controls situation, no happened any aggressive interaction among the confronted groups. The results verified for the experimental group they indicate that the behavioral status and the degree of the workers' bee experience modulate the type of aggressive response the conspecific non-nestmates ones. Encounters between groups of forager workers and of foragers with nurse workers, they resulted in mutual aggressiveness and high number of injured individuals. Result contrary to the found for newly-emerged workers, that, although they have begun some confrontations with forager or nurse workers, these never resulted in counterattacks, and consequently, in injured workers. Though, confronts between groups of nurse workers and nurses with newly-emerged workers, haven't result in perceptible physical damages. In the second chapter of this thesis, virgin queens of zero to three days were introduced in mini-colonies formed by populations of nurse or foraging bees. It was verified that the rejection of queens by foraging bees increases with the age of the queens, being the recently-emerged queens more tolerated. However in the encounters with nurse bees, most of the virgin queens they were accepted independently of the age, indicating that foraging bees and nurse bees of *M. quadrifasciata* react in different ways to the presence of virgin queens. In the third chapter of this thesis, copulated queens in laboratory conditions were introduced in mini-colonies constituted by foraging bees, nurse bees, recently-emerged

bees and mixed population. We verified that the worker bees age influences the time of pre-oviposition and survival of queens of *M. quadrifasciata* in laboratory conditions. The results indicate that, in colonies constituted by nurse bees the mortality was low, the number of queens in posture was elevated and the pre-oviposition period was reduced. In colonies with mixed population, the pre-oviposition period was similar to the colonies with nurse bees, however, the survival of the queens was shorter than in the treatment previously referred. However, in colonies constituted by recently-emerged bees, there was elevated mortality, delayed posture and reduced percentage of queens in posture. In colonies formed by forager workers no posture happened and all the queens died.

A close-up photograph of a bee, showing its head, thorax, and the beginning of its abdomen. The bee has a dark brown head with fine hairs, and its thorax is covered in similar hairs. The abdomen is segmented and features prominent yellow and black stripes. The background is a plain, light color.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas indígenas “sem ferrão” pertencem à tribo Meliponini, sendo encontradas em colônias permanentes que possuem, desde algumas dúzias, até milhares de operárias. Ao contrário de todas as outras abelhas e à semelhança dos Apini, possuem castas de fêmeas diferentes, tanto morfológica quanto comportamentalmente (MICHENER, 1974; MICHENER, 2000).

Os Meliponini têm distribuição Pantropical. Todavia, espécies do gênero *Melipona* são encontradas exclusivamente na região Neotropical (MICHENER, 1974; MICHENER, 2000).

No Brasil, as abelhas sem ferrão fazem parte do cotidiano das nações indígenas, que as domesticaram, e de boa parte das populações da zona rural, principalmente na região nordeste. Estas abelhas são criadas para coleta de mel e pólen, muito utilizados na medicina popular e como alimento. As espécies mais exploradas para este fim são: a tiúba (*Melipona compressipes* Fabricius) e a urucu do nordeste (*Melipona scutellaris* Latreille), nos estados do Maranhão e Pernambuco (NOGUEIRA-NETO, 1970; KERR, 1997), e a jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke), no estado do Rio Grande do Norte (CORTOPASSI-LAURINO & KOEDAM, 2000).

Além da produção de mel e pólen, os Meliponini são os principais polinizadores de grande parte das fanerógamas nativas. Estas abelhas são responsáveis pela polinização de cerca de 30% das espécies da Caatinga e do Pantanal Mato-grossense, e por até 90% em alguns fragmentos de Mata Atlântica e partes da Amazônia (KERR et al., 1994b). Além da polinização de áreas nativas, estas abelhas possuem grande potencial como polinizadores de cultivares comerciais (MAETA et al., 1992; KAKUTANI et al., 1993; SLAA et al., 2000; MACIAS et al., 2001; CASTRO, 2002; CRUZ et al., 2004; MALAGODI-BRAGA & KLEINERT, 2004; DEL SARTO et al., 2005), a exemplo do que já ocorre com *Bombus spp.* na polinização de tomates (HEEMERT et al., 1990), trevos (MACFARLANE et al., 1983) e kiwi (POMEROY, 1988; POMEROY & RICHARD, 2002); *Nomia melanderi* Cockerell e *Megachilidae rotundata* Fabricius na polinização da alfafa (RICHARDS, 1984).

Apesar da importância, tanto econômica quanto ecológica, muitas das espécies de Meliponini existentes no Brasil correm o risco de serem extintas (KERR et al., 1994b; KERR, 2002). A alteração de seu habitat pela ação antrópica tem resultado na transformação de florestas em capoeiras e na estratificação e descontinuidade das reservas, impedindo o cruzamento de colônias de diferentes regiões. Nestes casos, o

fluxo gênico entre as populações é nulo, ou quase, e muitas colônias morrem devido à consangüinidade ou "efeito Yokoyama e Nei" (YOKOYAMA & NEI, 1979). NASCIMENTO (1996) demonstrou que muitos parques, estações ecológicas e florestas registradas, possuem áreas insuficientes para manter 44 colônias e evitar problemas relacionados com a endogamia, necessárias para fixar pelo menos 6 alelos xo, sem os quais a população pode se extinguir em aproximadamente 15 gerações.

Como exemplos concretos do efeito da fragmentação de habitats sobre os meliponínios, podemos citar várias espécies de *Melipona* que eram comuns e que hoje são raras. A *Melipona bicolor* Lepeletier (pé-de-pau) não existe mais nas regiões próximas a Ribeirão Preto-SP. Essa espécie ainda pode ser encontrada nas poucas reservas de matas nativas que ainda restam no Estado do Espírito Santo. No município de Viçosa-MG está praticamente extinta, restringindo-se às reservas florestais da Prefeitura e da Universidade Federal de Viçosa (AIDAR, 1995). A *Melipona capixaba* Moure & Camargo, no estado do Espírito Santo, ocupa uma área de 100km de raio ao redor de Domingos Martins, cuja floresta está toda fragmentada e constitui somente 8% da mata original (NASCIMENTO, 1996). Em levantamento feito num ecossistema de cerrado no município de Cajuru no estado de São Paulo, não foi encontrada nenhuma espécie do gênero *Melipona* (PEDRO & CAMARGO, 1991). Estudos realizados por BATISTA et al. (2001a, b) em fragmentos de 20 hectares de floresta tropical úmida, no estado da Bahia, encontraram 12 espécies de abelhas sem ferrão, sendo que 2% eram do gênero *Melipona*. Conforme KERR (2002), nas regiões de Piracicaba, Rio Claro e Ribeirão Preto, não se encontra mais *M. quadrifasciata* Lepeletier e nem *Melipona fuliginosa* Lepeletier, embora sejam encontradas, raramente, *Melipona rufiventris* Lepeletier e *Cephalotrigona capitata* Schwarz.

A importância das abelhas cresce ao mesmo tempo em que, no ecossistema, aumenta o número de nichos ecológicos e, paralelamente, a proporção de espécies de plantas bissexuais ou dióicas e aquelas que são obrigatoriamente panmíticas (KERR, 1979). Dessa forma, a redução do número de colônias ou o desaparecimento de espécies de Meliponini, pela fragmentação de matas ou extrativismo predatório, poderá resultar no desencadeamento de processos cíclicos de desequilíbrio ecológico entre espécies inter-relacionadas (ROUBIK 1989; KERR, 1979; ABSY et al., 1984).

Um exemplo das implicações acima citadas foi observado por KERR et al. (1994a) em Mamirauá-AM, onde constataram, que apesar da proibição da caça aos macacos uacaris, sua população continuava em declínio. A razão para tal fato era a

utilização predatória, pelas comunidades indígenas e pelas populações ribeirinhas, de três espécies do gênero *Melipona* (*Melipona seminigra* Friese, *Melipona rufiventris* Lepeletier e *Melipona crinita* Moure & Kerr), polinizadores de centenas de árvores frutíferas daquela região, utilizadas na dieta dos macacos uacaris.

Embora, aspectos tanto ecológicos quanto econômicos, já tenham sido discutidos exaustivamente por KERR (1979, 1997, 2002) e KERR et al. (1994a, b), pesquisas envolvendo reprodução *ex situ* de abelhas “sem ferrão” ainda são escassas, particularmente, trabalhos de reprodução, manejo e manutenção destas abelhas em condições de laboratório.

Pesquisas com as finalidades acima referidas foram iniciadas por CAMARGO (1970). Esta autora desenvolveu um diluente de espermatozoides com o intuito de melhorar a técnica de inseminação artificial em *Apis mellifera* e, com base nesta descoberta, desenvolveu uma metodologia para inseminação de rainhas de Meliponini. CAMARGO (1972a, b) deu continuidade aos trabalhos realizados com a inseminação artificial de *A. mellifera*, melhorando a técnica através do ajuste do pH do diluente, o que facilitou a migração dos espermatozoides para a espermateca das rainhas. Além deste aspecto, esta pesquisadora desenvolveu metodologia para produzir rainhas do gênero *Scaptotrigona* em condições de laboratório, comprovando a influência do alimento na determinação de castas neste taxa. Esta metodologia foi adaptada para duas espécies do gênero *Melipona*, auxiliando na confirmação da teoria de KERR (1969), de que as castas em *Melipona* são determinadas pela interação de genes com o ambiente. Em pesquisa realizada com o intuito de investigar a produção de machos diplóides em *M. quadrifasciata*, CAMARGO (1972c, 1974) conseguiu realizar cópula sob condições controladas, colocando fêmea e macho em caixas plásticas. Em estudo mais abrangente, CAMARGO (1976) investigou aspectos relacionados com a produção de rainhas, produção de machos, determinação da maturidade dos machos, cruzamento natural em condições experimentais e formação de novas colônias. Estes estudos permitiram a esta autora investigar a determinação do sexo em *M. quadrifasciata*.

Com base nos trabalhos de CAMARGO (1974, 1976), AIDAR.(1995) formou colônias em condições de laboratório, comparando este procedimento com outros métodos de multiplicação artificial de colônias de *M. quadrifasciata*. Utilizando-se dos mesmos procedimentos quanto à cópula em condições de laboratório, MELO et al. (2001) investigaram a influência do aparelho genital masculino sobre o desenvolvimento ovariano de rainhas de *M. quadrifasciata* Lep.

Embora a técnica desenvolvida por CAMARGO (1974, 1976) tenha conseguido avanços consideráveis no que se refere aos cruzamentos controlados, tornando factíveis os estudos de genética realizados por esta autora, bem como, os demais trabalhos baseados neste método, o mesmo apresenta algumas deficiências. De acordo com CAMARGO (1976), de 29 cruzamentos realizados, somente 12, ou seja, 41,3% das rainhas que copularam realizaram postura. Mas, considerando que apenas 65% delas copulam, só 26,8% do total de rainhas utilizados em cruzamentos controlados chegam à fase de postura, sendo o tempo mínimo entre a cópula e o início da postura de 18 e o máximo de 49 dias. CAMARGO (1976) relaciona este fato a pouca eficácia do método de introdução de rainhas.

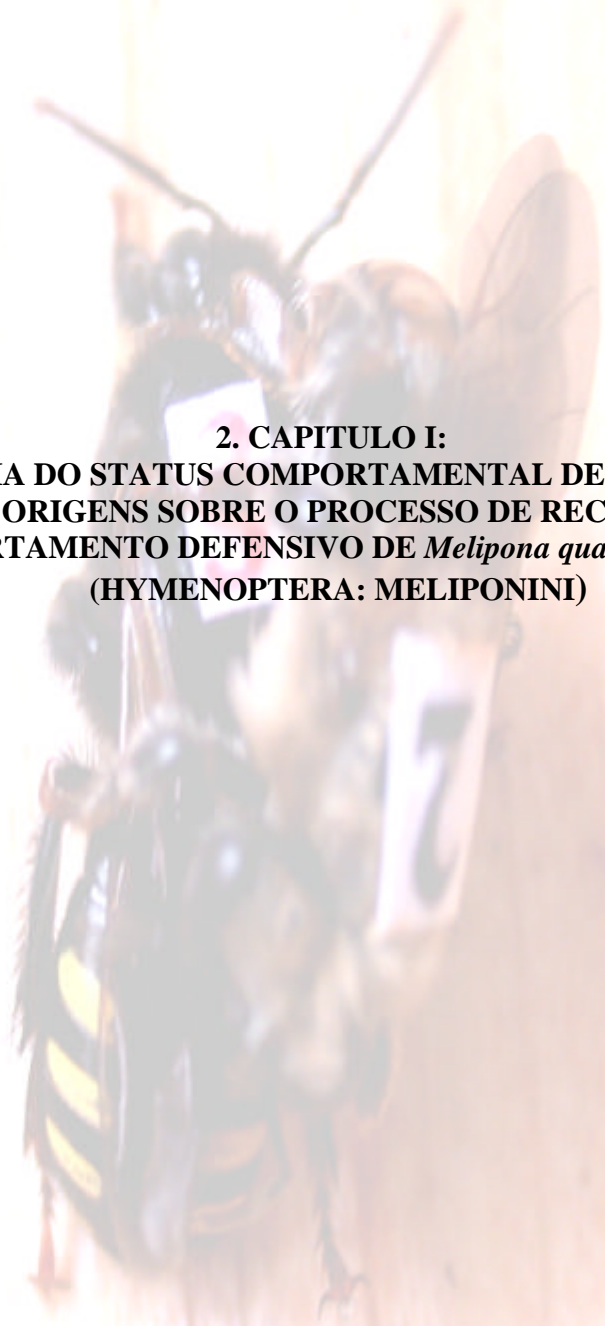
Estudos sobre o comportamento de acasalamento em Meliponini são raros, embora, as descrições dos trabalhos existentes indiquem que ocorram durante o vôo (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982). No entanto, como já citado anteriormente, rainhas e machos de *M. quadrifasciata* conseguem se acasalar em caixas plásticas. Todavia, nos trabalhos anteriormente citados, fatores pós-cópula, tais como: status comportamental e fisiológico das operárias utilizadas e condições de manejo inadequadas, podem ter influenciado a capacidade reprodutiva das rainhas, dificultado a ativação ovariana e, conseqüentemente, tendo reflexos no total de rainhas em postura e na grande variação do período inicial de oviposição.

1.4- OBJETIVOS

- Investigar a influência do *status* comportamental de operárias de diferentes origens sobre processo de reconhecimento e comportamento defensivo de *M. quadrifasciata*;

- Investigar a influência da idade das rainhas e do *status* comportamental das operárias no processo de aceitação de rainhas em *Melipona quadrifasciata*;

- Investigar a influência do *status* comportamental das operárias sobre a sobrevivência e período de pré-oviposição de rainhas de *M. quadrifasciata* em condições de laboratório



**2. CAPITULO I:
INFLUÊNCIA DO STATUS COMPORTAMENTAL DE OPERÁRIAS DE
DIFERENTES ORIGENS SOBRE O PROCESSO DE RECONHECIMENTO E
COMPORTAMENTO DEFENSIVO DE *Melipona quadrifasciata* Lep.
(HYMENOPTERA: MELIPONINI)**

2.1. INTRODUÇÃO

Uma das características mais relevantes dos insetos sociais é a capacidade de discriminar companheiros de ninho de intrusos. Indivíduos reconhecidos como estranhos provocam respostas agressivas, ao contrário daqueles reconhecidos como aparentados, que desencadeiam interações amigáveis. Esta habilidade capacita a colônia a lutar contra inimigos naturais e contra uma gama de competidores, inclusive da sua própria espécie. Isso evita que uma série de prejuízos sejam impingidos à colônia, tais como a perda de território, escravização, usurpação de ninho e roubo de recursos. Portanto, permite que as operárias armazenem recursos durante épocas de abundância, garantindo a manutenção e crescimento da colônia (MICHENER, 1974; HÖLLDOBLER & MICHENER, 1980; GAMBOA et al., 1986; STUART, 1987; BREED & BENNET, 1987; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Muitos autores têm assumido que reconhecimento de parentesco e companheiros de ninho, em insetos sociais, são geneticamente relacionados em diferentes níveis (MICHENER & SMITH, 1987; JAISSON, 1991; GETZ, 1991; INOUE, 1993). Não obstante a esta asserção, esses estudos também revelam que não é fácil separar o “verdadeiro” reconhecimento de parentesco do reconhecimento de companheiros de ninho, conceitualmente ou experimentalmente (CARLIN et al., 1990; GRAFEN, 1990, 1991; STUART, 1991; SHERMAN et al., 1997). De acordo com MORITZ (1991), embora a habilidade de reconhecer aparentados possa existir, não produz necessariamente comportamento discriminatório em condições experimentais.

A discriminação de companheiros de ninho geralmente envolve informações geneticamente codificadas, como odores espécie-específicos e padrões visuais, ou informação aprendidas pelos membros da colônia em encontros prévios com parasitas ou predadores (BATRA, 1964; MICHENER, 1974; HÖLLDOBLER & MICHENER 1980; WITTMANN, 1985; GAMBOA et al., 1986; BREED et al., 1988; CARLIN, 1989; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; BOWDEN et al., 1994; WITTMANN et al., 1990; DOWNS & RATNIEKS, 1999).

A maneira com que membros adultos de uma colônia compartilham pistas de reconhecimento entre companheiros de ninho corresponde a uma de três hipóteses

alternativas (CROZIER & DIX, 1979; HÖLLDOBLER & MICHENER, 1980; BUCKLE & GREENBERG 1981; BREED et al., 1985; MINTZER & VINSON, 1985; GETZ & SMITH, 1986; CARLIN & HÖLLDOBLER, 1987):

(1) Todos os membros da colônia podem reter a sua própria pista sem efetivamente transferir estas pistas entre os companheiros de ninho (hipótese individual). Sob este sistema, membros da colônia podem efetivamente aprender a totalidade das pistas que caracterizam seus companheiros de ninho ou podem aprender alguns componentes generalizados ou comuns destas pistas, dependendo da natureza das pistas (i.e., sua origem final, complexidade e variabilidade), da relevante aprendizagem e processo decisório. Este sistema pode somente ser viável com colônias relativamente pequenas ou em que os companheiros de ninho são proximamente relacionados. Este sistema tem sido demonstrado na abelha primitivamente social *Lasiglossum zephyrum* (BUCKLE & GREENBERG 1981) e pode ocorrer na formiga da acácia *Pseudomyrmex ferruginea* (MINTZER & VINSON, 1985).

(2) Pistas de reconhecimento podem ser produzidos individualmente pelos membros da colônia e transferidos reciprocamente entre os companheiros de ninho (hipótese coletiva). Em caso extremo, este compartilhamento de pistas pode ser extensivo, eliminando toda a variabilidade individual e produzindo um “verdadeiro” odor de colônia (“gestalt”) uniforme (CROZIER & DIX, 1979). No entanto, o compartilhamento de pistas não precisa necessariamente ter esta extensão; a discriminação de indivíduos pode apresentar uma ampla tolerância com relação a uma mistura aceitável de pistas (GAMBOA et al., 1986), e até mesmo uma quantidade limitada de odor compartilhado pode reduzir a variabilidade individual e simplificar o processo de discriminação. Em comparação com o sistema individual, o sistema coletivo pode facilitar o aumento da colônia nas quais pistas produzidas individualmente dentro da colônia são altamente variáveis, como pode ser o caso de colônias com múltiplas rainhas (poliginia) ou rainhas acasaladas várias vezes (poliandria). A hipótese coletiva têm sido proeminente na literatura teórica e empírica, mas evidências deste sistema ainda são fragmentarias e conflitantes (CROZIER & DIX, 1979; HOLIDOBLER & MICHENER, 1980; BUCKLE & GREENBERG 1981; BREED et al., 1985; MINTZER & VINSON, 1985; GETZ & SMITH, 1986; CARLIN & HÖLLDOBLER, 1987; BREED & BENNETT, 1987).

(3) Nesta hipótese, as rainhas podem funcionar como fontes primárias de pistas de reconhecimento que são transferidos para todos os membros da colônia e,

efetivamente, mascaram as pistas produzidas individualmente (hipótese da rainha). Este sistema também pode gerar um odor de colônia uniforme e pode facilitar o aumento do tamanho da colônia, mas pode se limitar às espécies com uma única rainha (monogínica) (CARLIN & HÖLLDOBLER, 1987).

As abelhas sem ferrão são abelhas eussociais com distribuição Pantropical, encontradas em colônias “permanentes”, que possuem desde algumas dúzias, até milhares de operárias (MICHENER, 1974, 2000; SAKAGAMI, 1982; ROUBIK, 1989). Constroem seus ninhos em uma diversidade de substratos, como ocos de árvores, ninhos de pássaros, termiteiros, formigueiros, abandonados ou não, cavidades no solo e coletam pólen, néctar e uma variedade de resinas. A grande quantidade de recursos armazenados torna estes ninhos atrativos a saqueadores, sejam estes co-específicos ou aloespecíficos (NOGUEIRA-NETO, 1970; MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; ROUBIK, 1989). Embora não possuam ferrão funcional, utilizam-se de uma variedade de formas de defesa, que vão desde beliscões com as mandíbulas, até a deposição de resinas e secreções glandulares sobre o corpo de potenciais invasores (NOGUEIRA-NETO, 1970; MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; ROUBIK, 1989).

Estudos recentes indicam que a competição interespecífica limitada por fonte de alimento conduziu à evolução de sistemas de recrutamento de grupo agressivo em abelhas sem ferrão (ROUBIK, 1989; NAGAMITSU & INOUE, 1997; SLAA et al., 1997; NIEH et al., 2004). Abelhas sem ferrão do gênero *Lestrimelitta* são cleptobióticas obrigatórias e vivem de roubos de alimento de outras espécies de abelhas sem ferrão. Operárias dos gêneros *Melipona*, *Tetragonisca* e *Oxytrigona*, ocasionalmente, roubam ou usurpam ninhos de co-específicos e/ou aloespecíficos (ROUBIK, 1989).

Esta competição agressiva pode ser custosa e crítica para sobrevivência da colônia, especialmente durante períodos de escassez de alimento (ROUBIK, 1989). No entanto, os padrões detalhados de comportamento agressivo em Meliponini, e a estratégia que os indivíduos em grupo se utilizam para estabelecer a dominância não são bem entendidos. BERNSTEIN (1981) conceitua dominância como uma assimetria nos padrões de agressão e submissão em encontros agonísticos.

Melipona quadrifasciata Lepeletier é uma espécie que ocorre ao longo da costa dos estados brasileiros, da Paraíba até o Rio grande do Sul. São conhecidas duas subespécies: *M. quadrifasciata anthidioides* e *M. quadrifasciata quadrifasciata*. Estas apresentam como características distintivas, bandas terciais interrompidas, no caso de *M. quadrifasciata anthidioides* e contínuas para *M. quadrifasciata quadrifasciata* (KERR,

1950). Uma típica colônia de *M. quadrifasciata* contém um total de 300–400 operárias (LINDAUER & KERR, 1960).

Como ocorre com os insetos sociais, com raras exceções, operárias adultas de colônias de *M. quadrifasciata* são resistentes à mistura com indivíduos de outras colônias, até mesmo da própria espécie. Exemplos de mistura natural de indivíduos de colônias diferentes são conhecidos para *Bombus* e *Melipona*. Geralmente isso ocorre quando uma espécie invade o ninho de outra, aniquila a rainha residente, se apropria das crias jovens e cuidam delas como se fossem seus próprios descendentes (SAKAGAMI & NISHIJIMA, 1973 apud MICHENER, 1974; ROUBIK, 1981). Alguns exemplos de mistura artificial de duas espécies têm sido relatados para *Bombus spp.* (MUNAKATA & SAKAGAMI, 1958; FREE & BUTLER, 1959 apud MICHENER, 1974), *Apis mellifera* (SAKAGAMI, 1959; ATWAL & SARMA, 1968 apud MICHENER, 1974), *Nanotrigona testaceicornis* e *Scaptotrigona postica* (NOGUEIRA-NETO, 1950; SILVA, 1977).

Melipona quadrifasciata, como a maioria dos Meliponini, possui uma arquitetura intranidal peculiar. O espaço onde estão as crias é separado por um invólucro do ambiente onde resinas, provisões e lixo são depositados (ROUBIK, 1989; SAKAGAMI, 1982; MICHENER, 1974; NOGUEIRA-NETO, 1970). Este tipo de arquitetura reflete a evolução de um sistema efetivo de divisão de trabalho (ROUBIK, 1989). As tarefas realizadas pelas operárias, em colônias com densidade populacional normal, possuem uma distribuição espaço-temporal. Operárias mais jovens (recém-emergidas e nutridoras) são encontradas mais freqüentemente na área de cria, enquanto que, operárias mais velhas (forrageiras, guardas e lixeiras) atuam mais nas áreas destinadas às provisões, lixo e resinas.

Dado ao custo relativo em cada contexto (REEVE, 1989, SHERMAN et al., 1997), nós predizemos que o custo resultante de encontros entre grupos de operárias de diferentes origens e status comportamental varia conforme o tipo de atividade desenvolvida pelas operárias em suas colônias de origem. Ou seja, operárias que desenvolvem atividades intranidais, tais como, cuidado com as crias e rainha, serão menos agressivas com co-específicos não familiares que desenvolvem a mesma atividade e mais agressivas com co-específicos não familiares que realizam atividades extranidais. De forma contrária, operárias que desenvolvem tarefas extranidais, como as forrageiras, serão mais agressivas na direção de forrageiras não familiares e mais tolerantes em relação à co-específicos estranhos que desenvolvem tarefas intranidais.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de setembro a outubro/2004. Foram utilizadas seis colônias de *M. quadrifasciata anthidioides* originárias das regiões de Piranga-MG (colônia **A**- nº 909), Viçosa-MG (colônia **B**- nº 828), Diogo Vasconcelos (colônia **C** - nº 917), zona rural de Cunha-MG (colônia **D**- nº 820), Rio Vermelho-MG (colônia **E**- nº 927) e Ribeirão Preto-SP (colônia **F**- nº 779). Todas as colônias foram mantidas em caixas de madeira (20 X 20 X 6 cm) estabelecidas em um fragmento natural de Mata Atlântica pertencente à Universidade Federal de Viçosa. Quando necessário estas colônias foram alimentadas com mel diluído e pólen de *Apis mellifera* fermentado (CAMARGO, 1976; AIDAR & CAMPOS, 1994; AIDAR, 1995, 1996; CAMPOS & PERUQUETTI, 1999). Foram utilizadas duas colônias para cada ensaio: iniciativa de ataque, colônias **A e B**; número de lutas com o tempo, colônias **C e D**; número de abelhas injuriadas após 1 hora de confronto, colônias **E e F**.

2.2.1 - Coleta das abelhas para os ensaios

As abelhas foram coletadas de acordo com a atividade desenvolvida na colônia. Operárias forrageiras foram capturadas com rede entomológica quando retornavam das atividades de coleta. As operárias nutridoras foram capturadas na área destinada aos discos de cria e identificadas de acordo com o padrão de coloração característico (FAGUNDES et al., 2006). Abelhas recém-emergidas foram obtidas de discos de cria das respectivas colônias e mantidos em estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a emergência, estes indivíduos foram marcados no tórax com cola colorida atóxica (Pelikan) e devolvidos às respectivas colônias de origem, sendo coletados para utilização nos bionsaios após um dia de convívio.

2.2.2. Bioensaios

Os confrontos entre grupos de dez indivíduos de diferentes origens e status comportamental, em todos os ensaios (**Iniciativa de agressão, Número de lutas com o tempo e Ocorrência de injúrias**), foram realizados numa caixa de madeira medindo 15 X 15 X 6 cm. Antes de serem liberados, cada grupo passou por um período de 5 min. dentro de uma caixa de madeira retangular medindo 3 X 12 X 3 cm, fechada com uma tela. Este procedimento foi adotado com o intuito de reduzir o estado de excitação. Não foi permitida a reutilização de qualquer indivíduo já testado. Todos os encontros foram filmados e fotografados, sendo anotadas as respostas comportamentais relacionadas a cada ensaio.

2.2.3. Iniciativa da agressão

Para este ensaio, foram feitas seis combinações entre as colônias **A** e **B** para o grupo experimental, envolvendo as respectivas classes comportamentais, sendo: operárias nutridoras da colônia **A** versus nutridoras da colônia **B** (**nutA X nutB**), operárias recém-emergidas da colônia **A** versus recém-emergidas da colônia **B** (**remA X remB**), operárias forrageiras da colônia **A** versus forrageiras da colônia **B** (**forrA X forrB**), operárias forrageiras da colônia **A** versus nutridoras da colônia **B** (**forrA X nutB**), operárias recém-emergidas da colônia **A** (um dia de idade) versus nutridoras da colônia **B** (**remA X nutB**) e operárias forrageiras da colônia **A** versus recém-emergidas (um dia de idade) da colônia **B** (**forrA X remB**). Para o grupo controle foram realizadas 12 combinações, sendo: entre operárias nutridoras da colônia **A** (**nutA X nutA**), operárias nutridoras da colônia **B** (**nutB X nutB**), operárias recém-emergidas da colônia **A** (**remA X remA**), operárias recém-emergidas da colônia **B** (**remB X remB**), operárias forrageiras da colônia **A** (**forrA X forrA**), operárias forrageiras da colônia **B** (**forrB X forrB**), operárias nutridoras da colônia **A** versus recém-emergidas da colônia **A** (**nutA X remA**), operárias nutridora da colônia **B** versus recém-emergidas da colônia **B** (**nutB X remB**), operárias nutridoras da colônia **A** versus forrageiras da colônia **A** (**nutA X forrA**), operárias nutridoras da colônia **B** versus forrageiras da colônia **B** (**nutB X forrB**), operárias recém-emergidas da colônia **A** versus forrageiras da colônia **A** (**remA X forrA**) e operárias recém-emergidas da colônia **B** versus forrageiras da colônia **B** (**remB X forrB**).

Os indivíduos foram marcadas com etiquetas numeradas de 1 a 10, com cores distintas para cada grupo. No decorrer de 10 min. de observação, foram anotados os números dos indivíduos que tomaram a iniciativa de agressão e seu respectivo status comportamental. Foi considerada agressão, toda vez que a operária perseguia, mordiscava ou segurava com as mandíbulas partes do corpo do outro indivíduo envolvido no encontro.

Neste ensaio, as iniciativas de ataque tomadas pelos indivíduos dos grupos confrontados, foram comparadas usando o teste-t Student para grupos independentes e o teste de Levine para verificar a homogeneidade das variâncias. O nível de significância adotado para as análises foi de 5%. As análises foram feitas usando o programa *Statistica 6.0* (Statsoft Inc., 2001).

2.2.4. Número de lutas com o tempo

Para este ensaio foram feitas cinco combinações entre as colônias **C** e **D**, envolvendo as respectivas classes comportamentais, sendo: operárias nutridoras da colônia **C** versus nutridoras da colônia **D** (**nutC X nutD**), forrageiras da colônia **C** versus forrageiras da colônia **D** (**forrC X forrD**), forrageiras da colônia **C** versus nutridoras da colônia **D** (**forrC X nutD**), recém-emergidas da colônia **C** versus nutridoras da colônia **D** (**remC X nutD**) e forrageiras da colônia **C** versus recém-emergidas da colônia **D** (**forrC X remD**). Os indivíduos foram pintados no tórax com cores distintas para cada grupo comportamental. A quantidade de lutas foi anotada a cada 15 min., durante uma hora de observação. Foram consideradas lutas, ataques realizados com o auxílio das mandíbulas, que resultaram no aprisionamento do indivíduo pelas pernas, antenas, asas e cabeça.

Neste ensaio foi utilizada ANOVA fatorial, com tempo (com 4 níveis: **15, 30, 45, 60 minutos**) e tratamento (com 5 níveis: **forrC X forrD, forrC X nutD, forrC X remD, remC X nutD e nutC X nutD**) como fatores categóricos. O nível de significância adotado para as análises foi de 5%. As análises foram feitas usando o programa *Statistica 6.0* (Statsoft In., 2001).

2.2.5. Ocorrência de injúrias

Para este ensaio foram feitas cinco combinações entre as colônias **E** e **F**, envolvendo as respectivas classes comportamentais, sendo: operárias nutridoras da colônia **E** versus nutridoras da colônia **F** (**nutE X nutF**), operárias forrageiras da colônia **E** versus forrageiras da colônia **F** (**forrE X forrF**), operárias forrageiras da colônia **E** versus nutridoras da colônia **F** (**forrE X nutF**), operárias recém-emergidas da colônia **E** versus nutridoras da colônia **F** (**remE X nutF**) e operárias forrageiras da colônia **E** versus recém-emergidas **F** (**forrE X remF**). Os indivíduos foram pintados no tórax com cores distintivas para cada grupo comportamental. Ao final de uma hora de observação foi anotada a quantidade de indivíduos injuriados. Foram consideradas injúrias todo o tipo de avaria que comprometesse a mobilidade das operárias envolvidas nos confrontos.

Neste ensaio foi utilizado ANOVA de Kruskal-Wallis para múltiplos grupos independentes. O nível de significância adotado para as análises foi de 5%. As análises foram feitas usando o programa *Statistica 6.0* (Statsoft Inc., 2001).

2.3. RESULTADOS

2.3.1 – Iniciativa de agressão

Confrontos realizados entre as diversas classes comportamentais de mesma origem (grupo controle), não resultaram em comportamento agressivo perceptível (**Tabela 1**). Os resultados verificados para o grupo experimental mostraram que nos encontros entre **forrA X nutB**, operárias nutridoras (**nutB**) tomaram mais iniciativa de ataque, havendo diferenças significativas ($p = 0,006$; **Tabela 1**). Os comportamentos filmados mostram que operárias nutridoras partem para o ataque mordiscando partes do corpo das operárias forrageiras, estendendo a glossa e solicitando alimento. Operárias forrageiras agem de forma submissa, dobrando o abdômen e girando sobre o próprio eixo, com a cabeça e antenas curvadas. Em quatro ocasiões a iniciativa de ataque partiu de mais de uma operária nutridora na direção de uma operária forrageira, o que impossibilitou a ação de contra-ataque (**Figura 1**). Durante o embate, cada operária nutridora segurou com as mandíbulas, uma perna ou antena, imobilizando a operária forrageira envolvida. Quando as operárias forrageiras tomaram a iniciativa o ataque foi rápido e, à semelhança do que ocorre com operárias nutridoras, agarram e mordiscam pernas, antenas e asas de suas agressoras.

Encontros entre grupos **forrA X forrB** foram mutuamente agressivos, não resultando em diferenças estatisticamente significativas quanto ao número de iniciativas de ataque ($p = 0,487$; **Tabela 1**).

Quando grupos **remA X nutB** foram confrontados, as operárias recém-emergidas tomaram mais iniciativas, havendo diferenças significativas ($p = 0,0001$; **Tabela 1**). O repertório de comportamentos filmados mostra que operárias recém-emergidas atacam operárias nutridoras de forma semelhante às operárias forrageiras experientes, prendendo pernas, antenas ou asas das operárias do grupo oposto. As operárias nutridoras agredidas agiam como se estivessem paralisadas. Em três ocasiões os ataques partiram de mais de uma operária recém-emergida na direção de uma operária nutridora. Somente em duas ocasiões operárias nutridoras atacadas contra-

atacaram. Quando forçadas, operárias nutridoras ofertaram alimento às operárias recém-emergidas (**remA**).

Encontros entre grupos **forrA X remB** também resultaram em mais iniciativas de ataque de operárias recém-emergidas (**Figura 2**), havendo diferenças significativas (**p= 0,0001; Tabela 1**). As interações resultantes no encontro destes dois grupos (**forrA X remB**) foram semelhantes aos do grupo de **nutB X remA**, excetuando-se interações trofaláticas, que só ocorreram duas vezes entre operárias do grupo **forrA X remB**. Nos encontros realizados entre grupos de operárias nutridoras (**nutA X nutB**) e grupos de operárias recém emergidas (**remA X remB**), não ocorreu qualquer tipo de interação agressiva perceptível.

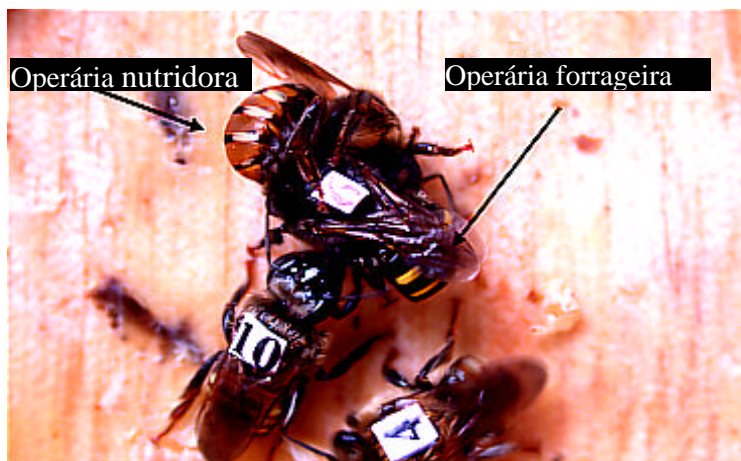


Fig. 1 – Operárias nutridoras atacando operária forrageira.

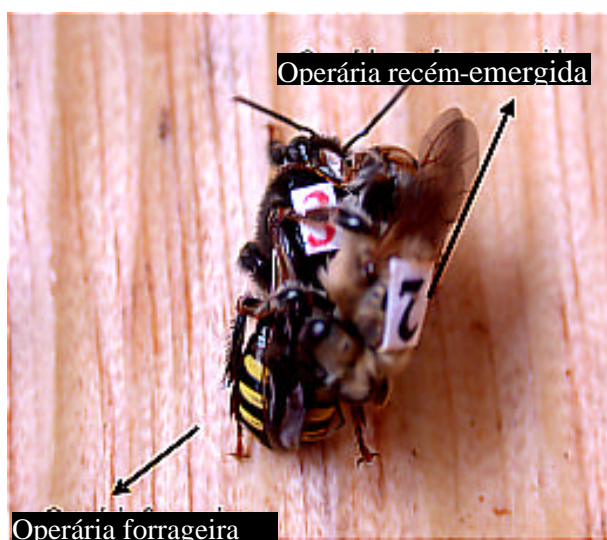


Fig. 2 – Operária recém-emergida atacando operária forrageira.

2.3.2. Número de lutas com o tempo

O número de lutas entre grupos confrontados foi afetado pela origem e status comportamental das operárias ($F(4, 40) = 53,572$; $p = 0,0001$), tempo ($F(3, 40) = 5,1546$; $p = 0,004$), e suas interações ($F(12, 40) = 16,133$; $p = 0,00001$). A média (\pm EP) de lutas envolvendo grupos de **forrC X forrD** começou moderada aos 15 min. ($3,3 \pm 0,3$), aumentando continuamente até atingir o máximo em 60 min. ($7 \pm 0,6$; Fig. 3; Tabela 2). Encontros entre os grupos **forrC X nutD** também se comportaram de forma semelhante ao tipo de encontro anterior. A quantidade de lutas começou moderada aos 15 min. ($3 \pm 0,6$), chegando a $3,6 \pm 0,3$ aos 30 min, passando por um aumento brusco

aos 45 min. ($6 \pm 0,6$), seguindo esta tendência até 60 min. ($8 \pm 0,6$; **Fig. 3; Tabela 2**). Encontros envolvendo grupos de **forrC X remD**, ao contrário dos grupos anteriores, tiveram o pico das interações agressivas nos 15 min. iniciais ($7,6 \pm 0,9$), caindo aos 30 min. ($2,3 \pm 1,2$), chegando a $0,3 \pm 0,6$ aos 45 min., até não haver qualquer interação agressiva visível aos 60 min. (**Fig. 3; Tabela 2**). Encontros envolvendo os grupos de **remC X nutD** desencadearam reações semelhantes as do grupo anterior, porém, com uma média de $5,6 \pm 0,6$ lutas nos 15 min. iniciais, caindo aos 30 min. ($2 \pm 1,5$), chegando a $0,3 \pm 0,6$ aos 45 min., mantendo-se neste mesmo patamar aos 60 min (**Fig. 3; Tabela 2**). Nos encontros realizados entre os grupos de **nutC X nutD** não ocorreu qualquer interação agressiva (**Fig. 3; Tabela 2**).

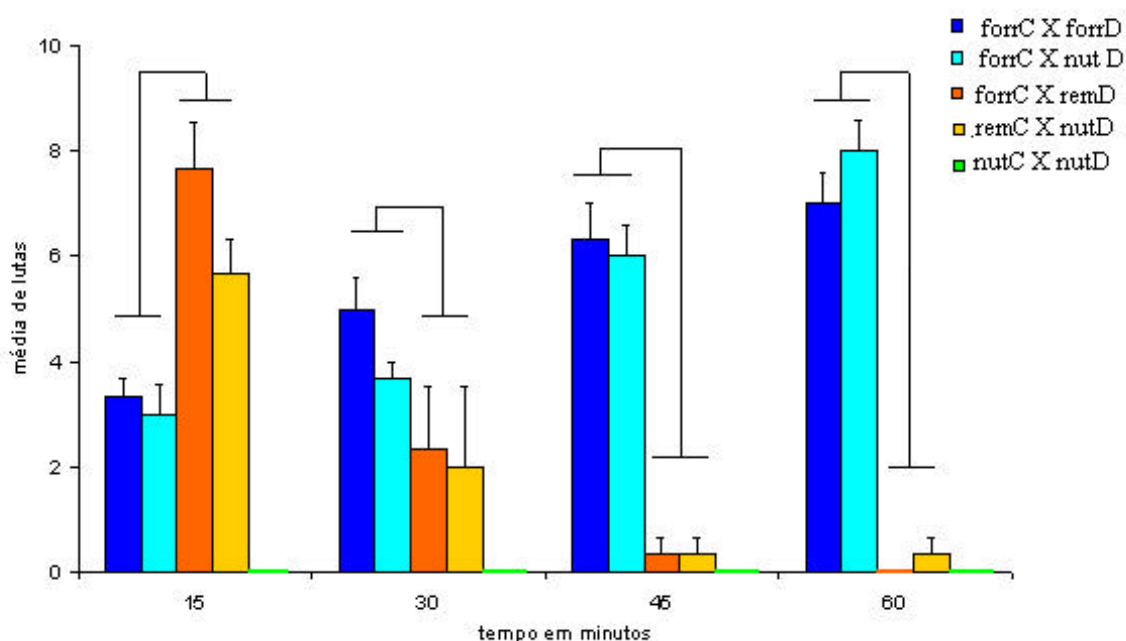


Figura 3- Média de lutas (\pm EP) ocorridas a cada 15min, durante 1h de observação, entre operárias de diferentes origens e status comportamental. As chaves representam diferenças significativas entre os grupos de **forrC- Forr**, **forrC – nutD X remC – nutD**, **forrC – remD**.

Contrastes planejados realizados entre os grupos de **forrC - forrD**, **forrC - nutD X remC - nutD**, **forrC - remD** foram significativamente diferentes ($t= 9,556$; $p= 0,0001$) uns dos outros (Fig. 3). Já os contrastes envolvendo os grupos de **forrC - nutD X forrC - forrD** e **remC - nutD X forrC - remD** não mostraram diferenças significativas (respectivamente, $t= -0,571$; $p= 0,571$ e $t= -1,142$; $p= 0,260$; Fig. 3).

Tabela 2– Média (\pm EP) de lutas entre operárias de *M. quadrifasciata* de diferentes origens e status comportamental, em intervalos de 15 minutos, durante uma hora de observação.

		Tempo em minutos			
Tratamento	Rep	15	30	45	60
*forrC X forrD	1	3	6	7	7
	2	4	5	5	6
	3	3	4	7	8
Total		10	15	19	21
Média (\pm EP)		3,3 \pm 0,3	5 \pm 0,6	6,3 \pm 0,6	7 \pm 0,6
forrC X *remD	1	6	4	0	0
	2	8	0	0	0
	3	9	3	1	0
Total		23	7	1	0
Média (\pm EP)		7,6 \pm 0,8	2,3 \pm 1,2	0,3 \pm 0,3	0 \pm 0
forrC X *nutD	1	3	4	6	7
	2	2	3	5	8
	3	4	4	7	9
Total		9	11	18	24
Média (\pm EP)		3 \pm 0,6	3,6 \pm 0,3	6 \pm 0,6	8 \pm 0,6
remC X nutD	1	5	5	1	1
	2	7	0	0	0
	3	5	1	0	0
Total		17	6	1	1
Média (\pm EP)		5,6 \pm 1,1	2 \pm 2,6	0,3 \pm 0,6	0,3 \pm 0,6
nutC X nutD	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
Total		0	0	0	0
Média (\pm EP)		-	-	-	-
Total geral		59	39	39	46

*forr = operária forrageira ;

*rem = operária recém-emergida;

*nut = operária nutridora

2.3.3. Ocorrência de injúrias

O teste de Kruskal-Wallis mostrou que o número de operárias injuriadas foi influenciado pelo tipo de encontro (**KW- H(4,20)= 15,2788; p= 0,00042; Figura 4**). Ao final de uma hora de confronto, a média (\pm DP) de operárias injuriadas foi maior entre os grupos de **forrE X forrF (11,75 \pm 1,9)** e **forrE X nutF (10,25 \pm 2; Tabela 3)** Nos encontros do tipo **forrE X remF, nutE X nutF e remE X nutF**, a média de operárias injuriadas foi irrisório (**0,25 \pm 0,4; Tabela 2**).

A comparação entre os grupos de **forrE X forrF e forrE X nutF** não apresentou diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney; **U = 5; p = 0,4**) quanto ao número de operárias injuriadas. Contrastes realizados entre o grupo de **forrE X forrF** com **forrE X remF, nutE X remF e nutE X nutF** foram estatisticamente significativas (Mann-Whitney; **U= 0,00; p= 0,02**). Resultado igual ao encontrado para contrastes envolvendo **forrE X nutF** com **forrE X remF, nutE X remF e nutE X nutF** (Mann-Whitney; **U= 0,00; p= 0,02**). Já nos contrastes envolvendo **forrE X remF** com **nutE X remF e nutE X nutF** não ocorreram diferenças estatisticamente significativas (Mann-Whitney; **U= 8; p= 1**). Comparações realizadas entre **nutE X remF e nutE X nutF** tiveram resultados iguais ao grupo anterior (Mann-Whitney; **U= 8; p= 1**).

Tabela 3– Número de operárias injuriadas após 1 hora de observação em confrontos entre operárias das colônias **E e F**.

Repetições	Tratamento				
	forrE x forrF	forrE x nutF	forrE x remF	nutE x remF	nutE x nutF
1	13	12	0	1	0
2	11	7	1	0	0
3	9	12	0	0	1
4	14	10	0	0	0
Media (\pm DP)	11,75 \pm 1,9	10,25 \pm 2	0,25 \pm 0,4	0,25 \pm 0,4	0,25 \pm 0,4

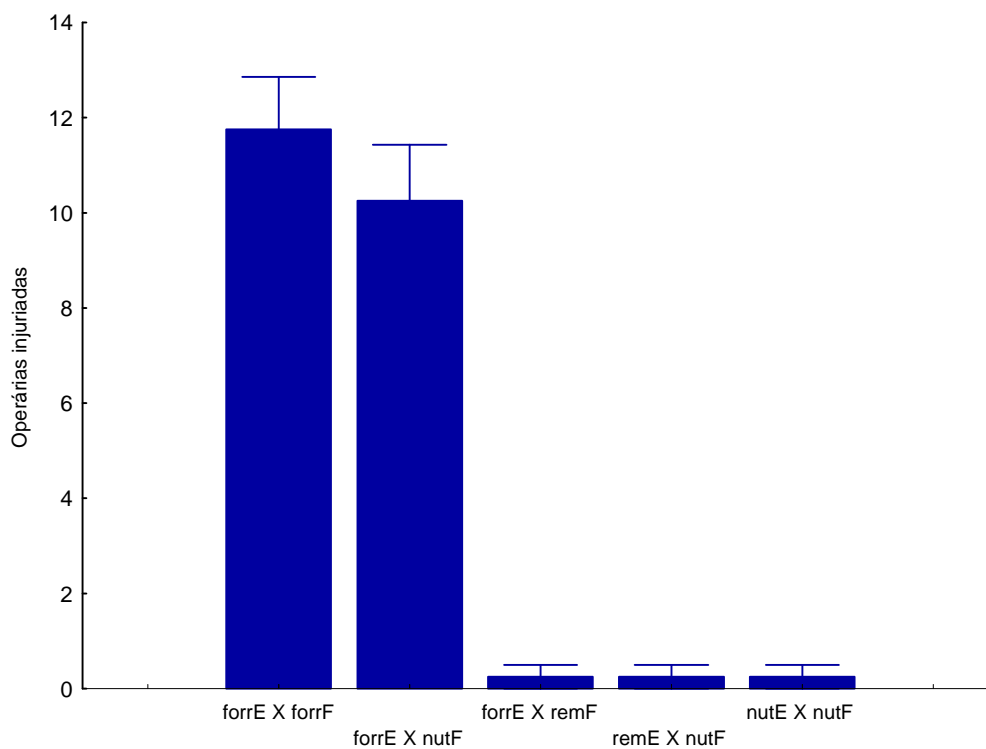


Fig. 4- Média (\pm DP) de operárias de *M. quadrifasciata* injuriadas após uma hora de confronto entre operárias de diferentes origens e status comportamental, em arena neutra (KW- $H(4,20)= 15,2788$; $p= 0,00042$).

2.4. DISCUSSÃO

A ausência de qualquer resposta agressiva perceptível verificada para o grupo controle, indica que operárias de *M. quadrifasciata* reconhecem companheiras de ninho fora do seu espaço de origem, independentemente do tipo de atividade desenvolvida momentos antes dos encontros.

No experimento de iniciativa de ataque, encontros entre grupos de operárias forrageiras de diferentes colônias resultaram em agressividade mútua, demonstrando que operárias dessa classe comportamental foram capazes de encontrar dissimilaridade entre suas assinaturas e as assinaturas familiares por elas aprendidas. Baseado nos custos e benefícios relativos neste contexto (REEVE, 1989), o limite de aceitação adotado por esta classe comportamental foi restritivo, indicando que os custos de aceitação são altos. Justificável, uma vez que, operárias forrageiras são capazes de saquear ou usurpar ninhos (MICHENER, 1974; SOMMEIJER, 1984; ROUBIK, 1989).

Então, porque operárias forrageiras raramente iniciaram ataques contra operárias nutridoras, só reagindo através de contra-ataques? Uma das explicações é que o conjunto de assinaturas químicas pertencentes à memória olfativa das abelhas forrageiras, não inclui abelhas nutridoras como possíveis invasoras. Por outro lado, sendo insetos eussociais possuidores de capacidade de aprendizagem, é plausível supor que estes possuam algum limite de tolerância a estímulos nocivos que os capacite a reagir de acordo com a intensidade do estímulo. A capacidade de reagir a estímulos nocivos ou ameaçadores é uma característica universal da vida animal (BATESON, 1992). Ao contrário de operárias recém-emergidas, operárias nutridoras já possuem mandíbulas totalmente esclerotizadas e capazes de causar injúrias em encontros agressivos (SAKAGAMI, 1982), justificando, portanto, a adoção por operárias forrageiras de um limite de aceitação restritivo em encontros com operárias nutridoras.

Qual o significado da passividade de operárias forrageiras diante do ataque de operárias recém-emergidas? Novamente, uma das explicações para esta reação se deve a não evolução pela memória olfativa de uma resposta para pistas produzidas por um invasor recente (MATEO, 2004). Desta forma, o conjunto de “assinaturas químicas”

pertencentes à memória olfativa das operárias forrageiras, não incluem abelhas recém-emergidas como possíveis invasoras. Portanto, o risco de injúria ou morte é mínimo, sendo adotado neste contexto, um limite de aceitação permissivo. Estudos realizados com *Melipona fasciata* (INOUE & ROUBIK, 1990), *Trigona (tetragonula) minangkabau* (SUKA & INOUE, 1993), *Scaptotrigona barrocoloradensis* (SUKA et al., 1994) e *Melipona panamica* (INOUE et al., 1999), indicam que operárias recém-emergidas de diferentes colônias são aceitas mais facilmente por operárias de idade mais avançada, mesmo sendo reconhecidas como estranhas.

Até o momento, os componentes percepção e ação do processo de reconhecimento (MATEO, 2004; LIEBERT & STARKS, 2004) foram discutidos do ponto de vista das abelhas forrageiras. Mas, porque nutridoras e recém-emergidas tomaram mais iniciativa de ataque nos encontros com operárias forrageiras? Em *Scaptotrigona bipunctata*, operárias jovens são mais agressivas na direção de operárias mais velhas que o oposto (JUNGNICKEL, et al., 2004). Operárias nutridoras estão diretamente envolvidas no processo de postura e provisionamento (**POP**) em Meliponini, sendo indiretamente responsáveis pela nutrição da rainha e operárias recém-emergidas (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; SOMMEIJER, 1984; SOMMEIJER & BRUIJN, 1994). A adoção de um limite de aceitação restritivo pelas operárias nutridoras é altamente justificável. A aceitação de indivíduos estranhos, neste contexto, poderia gerar altos custos para a colônia, reduzindo a população de operárias nutridoras ligadas ao processo reprodutivo e, principalmente, a oferta de proteínas necessárias ao desenvolvimento de operárias recém-emergidas e a manutenção da capacidade reprodutiva da rainha. Isso poderia levar a morte da rainha e ao paulatino declínio da colônia.

Já nos encontros entre grupos de operárias nutridoras e de recém-emergidas, explicações referentes ao componente percepção do processo de reconhecimento (REEVE, 1989; GAMBOA, et al., 1991; GAMBOA, 2004; MATEO, 2004), são semelhantes às aplicadas aos encontros entre grupos de operárias forrageiras e recém-emergidas. Portanto, embora operárias recém-emergidas reconheçam nutridoras e forrageiras como estranhas e promovam ataques, o baixo custo gerado por esta classe comportamental favorece a sua aceitação.

Quanto à capacidade de operárias recém-emergidas reconhecerem indivíduos estranhos, mesmo sendo inexperientes, corroboram com resultados encontrados em trabalhos realizados com outras espécies de insetos sociais, de que pistas de

reconhecimento e memória olfativa são adquiridas logo após a emergência (ERRARD, 1986; CARLIN & HÖLLDOBLER, 1986, 1987; CARLIN et al., 1987; ERRARD et al., 1990; STUART, 1992). Contudo, apesar de haver ataque de recém-emergidas na direção de operárias nutridoras e forrageiras, este comportamento cessa com o tempo, indicando, de que a despeito de reconhecer operárias forrageiras e nutridoras como não familiares, a ausência de contra-ataque por parte destes grupos pode ter acrescentado novas informações à sua memória olfativa. O resultado dessa aprendizagem leva abelhas recém-emergidas a tratarem operárias forrageiras e nutridoras não familiares como uma nova classe de companheiras, e desta forma, a adotar um limite de aceitação permissivo. Outro aspecto a ser salientado diz respeito a pouca experiência das operárias recém-emergidas (um dia de idade), devido a sua breve história de vida. Em *Apis mellifera*, interações operária-operária são responsáveis pela plasticidade da divisão de trabalho em relação às necessidades específicas da colônia (HUANG et al., 1998; HUANG & ROBINSON, 1992, 1996). Em colônias de *Componotus floridanus*, indivíduos jovens necessitam ter contato com operárias forrageiras e nutridoras para expressarem normal reconhecimento de companheiras de ninho, quando estiverem maduras (MOREL & BLUM, 1988). Portanto, o ambiente social e suas interações são importantes para que o processo de reconhecimento de companheiros de ninho seja manifestado em sua plenitude.

Encontros entre operárias nutridoras de diferentes origens, surpreenderam devido à ausência de comportamento agressivo perceptível. Indicando que não existiu discriminação, pois, não existiu um tratamento diferenciado por parte destes indivíduos (MATEO, 2004; GAMBOA, 2004). Indivíduos não familiares tendem a tocar, olhar, cheirar, antenar mais e mais freqüentemente do que indivíduos familiares ou parentes próximos (LIEBERT & STARKS, 2004).

Embora não tenhamos estudado a influência de hidrocarbonetos cuticulares neste capítulo de tese, uma das explicações para a tolerância entre os grupos de operárias nutridoras pode estar relacionada com a composição de **HCs** destas abelhas. Trabalho realizado em vespas por DANI et al. (1996) sugerem que alcanos possuem fraca atividade feromonal. Operárias nutridoras de *M. bicolor* (ABDALLA et al., 2003), *M. quadrifasciata* e *M. marginata* (ABDALLA, dados não publicados), possuem alta porcentagem de **HCs** saturados. Estes autores sugerem que estes **HCs** possuem pouca eficiência como pista de reconhecimento. Como discutido por LIEBERT & STARKS (2004), ausência de discriminação entre co-específicos de diferentes origens não denota

ausência de reconhecimento. A resposta comportamental exibida pelas operárias nutridoras pode indicar que o conjunto de pistas existente em sua memória olfativa não incluem operárias que desempenham a mesma atividade como prováveis agressoras, mesmo sendo de origem diferente. Portanto, a adoção de um limite de aceitação permissivo evitaria altos custos para ambos os grupos. Como explicitado anteriormente, operárias nutridoras desempenham importante papel no processo de postura e provisionamento e aspectos relacionados à nutrição da rainha e operárias jovens (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; SOMMEIJER & BRUIJN, 1994).

INOUE et al. (1999) relataram que em *M. panamica*, só guardas intranidais são capazes de discriminar abelhas forasteiras daquelas residentes. No entanto, nossos resultados indicam que, excetuando-se encontros entre grupo de nutridora *versus* nutridora e recém-emergidas *versus* recém-emergidas, todas as classes comportamentais foram capazes de reconhecer e discriminar co-específicos de acordo com sua origem. Estes dados podem estar revelando aspectos importantes do comportamento de defesa desta espécie, e seguramente, de outras espécies pertencentes à tribo Meliponini.

Abelhas sem ferrão empregam não menos que 13 diferentes meios para defender as suas colônias (MICHENER, 1974). A indicação de que todas as classes comportamentais empregadas neste trabalho apresentaram comportamento defensivo, revela, que a despeito de existir uma classe comportamental mais apta para esta função (operárias guarda) (MICHENER, 1974, ROUBIK, 1989), a colônia não pode depender estritamente desta para se proteger. Aqui, nós sugerimos a existência de uma estratégia de defesa que leva em conta, principalmente, a expectativa de vida dos envolvidos como meio de reduzir custos à colônia. Como regra, tarefas mais seguras são realizadas em estágios de vida anterior àquelas mais arriscadas (SEELEY, 1982; SHMID-HEMPEL & SHMID-HEMPEL 1984; ROUBIK, 1989; BIESMEIJER. & TÓTH, 1998; TOFILSKI, 2002).

Ataques de co-específicos ou aloespecíficos, geralmente ocorrem em grupo. Neste contexto, a primeira barreira de proteção é encontrada na entrada e periferia do ninho, onde operárias de idade mais avançada lutam para impedir saqueadores ou usurpadores de ninhos. Portanto, em caso de morte destas operárias, o custo para colônia seria menor. Por sua vez, operárias nutridoras representam a segunda barreira de proteção, sendo diretamente responsáveis pela proteção da rainha e operárias recém-emergidas. Justificável como segunda opção de defesa, devido ao alto custo que acarretariam para a colônia, caso a população destas operárias diminuísse drasticamente.

Operárias que desempenham esta tarefa são jovens (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; ROUBIK, 1989) e ainda podem contribuir, por muito tempo, para o crescimento e manutenção da colônia. Sem contar que, na ausência dessas operárias, ocorreria uma redução acentuada da produtividade da rainha (SOMMEIJER & BRUIJN, 1994).

Hidrocarbonetos cuticulares estão incluídos na classe dos feromônios liberadores ou feromônios de superfície (WILSON, 1963). Devido a estes feromônios permanecerem adsorvidos na superfície do corpo, eles são percebidos por outros indivíduos através de contato direto ou através de curtas distâncias (SHOREY, 1973). Esta característica pode ser adaptativa, porquê evita que ocorra a rejeição de indivíduos familiares e embates desnecessários, minimizando os custos de uma decisão equivocada (REEVE, 1989; LIEBERT & STARKS, 2004). Isso explica porque o número de embates entre os grupos de **forrC X forrD** e **forrC X nutD** começa moderado nos primeiros 15 min., todavia, assim que o reconhecimento vai sendo consolidado, os encontros tornam-se cada vez mais agressivos. O que resulta em contra-ataques de ambas as classes comportamentais (nutridoras e forrageiras), levando ao aumento contínuo do número de lutas.

INOUE et al. (1999), em trabalho realizado com *M. panamica*, reportaram que o grau de excitabilidade das operárias forrageiras varia com o aumento dos distúrbios (risco de invasão), tendo como resultado, o aumento da mortalidade de indivíduos familiares e não familiares. De acordo com nossos dados, este padrão também se aplica a operárias nutridoras quando estas são confrontadas com operárias forrageiras de origem diferente da sua. Encontros entre recém-emergidas e grupos de operárias nutridoras e operárias forrageiras, resultaram em um número elevado de lutas nos primeiros 15 min., declinando totalmente até o período final de observação (60 min.). Isto indicando que, apesar de reconhecer abelhas forrageiras e nutridoras como não familiares, a ausência de contra-ataques por parte destes grupos pode ter acrescentado novas informações à memória olfativa das operárias recém-emergidas. O resultado dessa aprendizagem pode ter levado operárias recém-emergidas a tratarem operárias forrageiras e nutridoras não familiares como uma nova classe de companheiros.

Uma série de investigadores tem demonstrado que operárias recém emergidas são mais toleradas pelas colônias de insetos sociais, mesmo sendo de origem diferente (MICHENER, 1974; CAMARGO, 1976; MOREL et al., 1988; BREED et al., 1988; INOUE & ROUBIK, 1990; JEANNE et al., 1992; SUKA & INOUE, 1993; VENKATARAMAN & GADAKAR, 1993; SUKA et al., 1994; INOUE et al., 1999;

LORENZI et al., 1999). Uma das explicações para este comportamento, é que operárias recém emergidas ainda carecem de um odor de colônia, e então, não são reconhecidas como forasteiras (MICHENER, 1974; PANEK et al., 2001). Outro fator está relacionado ao componente percepção do processo de reconhecimento (MATEO, 2004). Operárias forrageiras e nutridoras não incluem operárias recém-emergidas como uma classe de intrusos, devido ao baixo custo que possa advir, caso ocorra uma decisão equivocada. Como já explicitado no experimento de número um, o comportamento de operárias nutridoras de diferentes origens não se alterou com a progressão dos contatos.

No experimento de número três, verificamos que o número de contra-ataques aumenta com a idade das operárias (**forrE X forrF** e **nutE X forrF**) e com a intensificação dos contatos agressivos. Estes dados corroboram, em parte, com aqueles encontrados para *M. panamica* (INOUE et al., 1999), considerando que, o desenho experimental utilizado nos ensaios desta tese, difere do adotado pelo autor anteriormente citado, o que deve ter influenciado os resultados.

Estudos com formigas *Pogonomyrmex barbatus* e *Camponotus vagus* (BONAVITA-COUGOURDAN et al., 1993; WAGNER et al., 1998), térmitas *Reticulitermes virginicus* e *Coptotermes formosanus* (HOWARD et al., 1982; HAVERTY et al., 1996) e abelhas *Melipona bicolor* (ABDALLA et al., 2003), verificaram que grupos de operárias que desenvolvem diferentes tarefas diferem na composição dos **H**Cs, sugerindo que o perfil destes compostos muda com a idade.

Embora neste capítulo de tese não se tenha estudado o perfil químico de Hidrocarbonetos cuticulares, é plausível supor que, a exemplo do verificado para *M. bicolor* (ABDALLA et al., 2003), também ocorra uma variação na composição dos hidrocarbonetos cuticulares em operárias de *M. quadrifasciata* que desenvolvem diferentes atividades na colônia, e que, a assimetria das respostas agressivas desencadeadas entre operárias de diferentes origens e status comportamental, também possa estar sendo influenciada por estes compostos.

Devido às pistas de reconhecimento em *M. quadrifasciata* não serem estáveis, o limite de aceitação adotado entre os indivíduos, nos três ensaios deste capítulo de tese, foi flexível e contexto dependente, com operárias sendo mais restritivas ou permissivas, dependendo dos custos gerados em função do status comportamental e origem das operárias no momento dos encontros.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABDALLA, F. C., JONES, G. R., MORGAN, E. D. & CRUZ-LANDIM, C. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Gen. Molec. Res.*, **2**, 191-199.
- AIDAR, D. S. & CAMPOS, L. A. O. 1994. Resposta de meliponínios à alimentação artificial (*Melipona quadrifasciata* Lep, Meliponinae, Apidae). In: *Ann. Enc. Etologia*, pp. 105. Cananéia-SP.
- AIDAR, D. S. 1995. Multiplicação Artificial e Manejo de Colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa (Dissertação Ms.).
- AIDAR, D. S. 1996. *A Mandaçaia: Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de Melipona quadrifasciata Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)*. Ribeirão Preto- SP: Sociedade Brasileira de Genética
- BATESON, P. 1992. "Do Animals Feel Pain?" *New Scientist*, **25**, 30-33.
- BATRA, S.W.T. 1964. Organisms associated with *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae). *J. Kans. Entomol. Soc.*, **38**, 367-89
- BERNSTEIN, I. S. 1981. Dominance: the baby and the bathwater. *Behav. Brain Sci.*, **4**, 419-457.
- BIESMEIJER, J. C. & TÓTH, E. 1998. Individual foraging, activity level and longevity in the stingless bee *Melipona beecheii* in Costa Rica (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Insectes Soc.*, **45**, 427- 443.
- BONAVITA-COUGOURDAN, A., CLEMENT, J. L. & LANGE, C. 1993. Functional subcaste discrimination (foragers and brood-tenders) in the ant *Camponotus vagus* Scop.: Polymorphism of cuticular hydrocarbon patterns. *J. Chem. Ecol.*, **19**, 1461-1477.
- BOWDEN, R. M, GARRY, M. F. & BREED, M. D. 1994. Discrimination of con- and heterospecific bees by *Trigona (Tetragonisca) angustula* guards. *J. Kans. Entomol. Soc.*, **67**, 137-39
- BREED, M. D. & BENNETT, B. 1987. Kin recognition in highly eusocial insects. In: *Kin Recognition in Animals* (Ed. by FLETCHER, D. J. C. & MICHENER, C. D.), pp. 243-285. New York: John Wiley & Sons.

- BREED, M. D., WILLIAMS, K. R. & FEWELL, J. H. 1988. Comb Wax mediate the acquisition of nest-mate recognition cues in Honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 8766 - 8769.
- BREED, M. D., BUTLER, L. & STILLER, T. M. 1985. Kin recognition by worker honey bees in genetically mixed groups. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **82**, 3058-3061.
- BUCKLE, G.R. & GREENBERG, L. 1981. Nestmate recognition in sweat bees (*Lasioglossum zephyrum*): Does an individual recognize its own odour or only odours of its nestmates? *Anim. Behav.*, **29**, 802-80
- CAMARGO, C. A. 1976. Determinação do sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP (Tese D.S.).
- CAMPOS, L. A. & PERUQUETTI, R. C. 1999. Biologia e Criação de abelhas sem Ferrão. In: *Informe Técnico*, pp. 36. Viçosa-MG: Imprensa Universitária-Universidade Federal de Viçosa-UFV.
- CARLIN, N.F., FRUMHOFF, P.C., PAGE, R. E., BREED, M. D., GETZ, W. M., OLDROYD, B.P., RINDERER, T. E. & ROBINSON, G. E.. 1990. Nepotism in the honey bee. *Nature*, **346**, 706-708.
- CARLIN, N. F. & HÖLLDOBLER, B. 1986. The kin recognition system of carpenter ants (*Camponotus spp.*) I. Hierarchical cues in small colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **19**, 123-134.
- CARLIN, N. F. & HÖLLDOBLER, B. 1987. The kin recognition system of carpenter ants (*Camponotus spp.*).II. Larger colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **20**, 209-217.
- CARLIN, N. F. 1989. Discrimination between and within colonies of social insects: two null hypotheses. *Neth. J. Zool*, **39**, 86 -100.
- CARLIN, N. F., HÖLLDOBLER, B. & GLADSTEIN, D. S. 1987. The kin recognition system of carpenter ants (*Camponotus spp.*) III. Within-colony discrimination. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **20**, 219 - 227.
- CROZIER, R. H. & DIX, M.W. 1979. Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **4**, 217-224.
- DANI, F. R., TURILLAZZI, S. & MORGAN, E. D. 1996. Dufour gland secretion of *Polistes* wasp: chemical composition and possible involvement in nestmate recognition (Hymenoptera: Vespidae). *J. Insect Physiol.*, **42**, 541-548.
- DOWNS, S. G. & RATNIEK, F. L. W. 1999. Recognition of conspecifics by honey bee forrrds use non-heritable cues acquired in the adult stage. *Anim. Behav.*, **58**, 643 - 648.

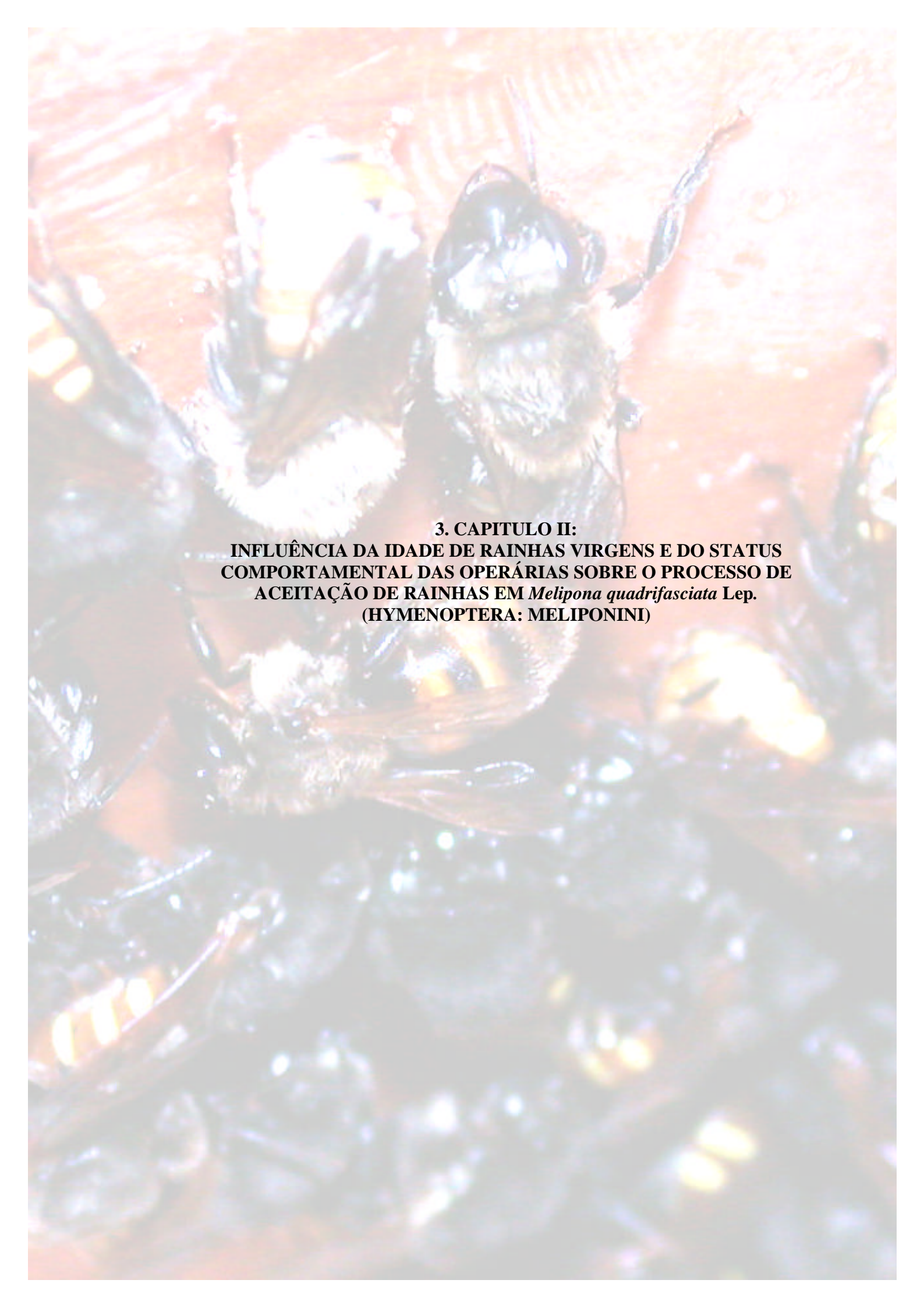
- ERRARD, C. 1986. Role of early experience in mixed-colony odor recognition in the ants *Manica rubida* and *Formica selysi*. *Ethology*, **72**, 243-249.
- ERRARD, C., BAGNÈRES, A. G. & LANGE, C. 1990. Change of the specific chemical signatures of two ants species reared in mixed colonies (*Formica selysi*, Formicinae and *Manica rubida*, Myrmicinae). In: *Social Insects and the Environment* (Ed. by VEERESH, G. K., MALLIK, B. & VIRAKTAMATH, C. A.), pp. 408. New Delhi: Oxford & IBH Publ. Co. Pvt. Ltd.
- FAGUNDES, I. B., SERRÃO, J. E. & CAMPOS, L. A. O. 2006. Tergite pigmentation indicate hypopharyngeal gland developmental degree in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, **48**, 1-12.
- GAMBOA, G. J. 2004. Kin recognition in esocials wasp. *Ann. Zool. Fenici*, **41**, 789 – 808.
- GAMBOA, G. J., FOSTER, R. L., SCOPE, J. A. & BITTERMAN, A. M. 1991. Effects of stage colony cycle context and intercolony distance on conspecific tolerance by paper wasps, *Polistes fuscatus*. *Behavioural Ecol. Sociob.*, **29**, 87-94.
- GAMBOA, G. J., REEVE H.K., FERGUSON, D. & WACKER, T. L. 1986. Nestmate recognition in social wasps: The origin and acquisition of recognition odours *Anim. Behav.*, **34**, 685 - 695.
- GETZ, W. M. & SMITH, K.B. 1986. Honey bee kin recognition: learning self and nestmate phenotypes. *Anim. Behav.*, **34**, 1617-1626.
- GETZ, W.M., 1991. The honey bee as a model kin recognition system. In: *Kin Recognition* (P.G. Hepper, Ed.), pp. 358–412., Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.
- GRAFEN, A. 1990. Do animals really recognize kin? *Anim. Behav.*, **39**, 42–54
- GRAFEN, A. 1991. Kin vision? a reply to Stuart. *Anim. Behav.*, **41**, 1095–1096
- HAVERTY, M. I., GRACEE, J. K., NELSON, L. J. & YAMAMOTO, R. T. 1996. Intercaste, intercolony, and temporal variation in cuticular hydrocarbons of *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera, Rhinotermitidae) *J. Chem. Ecol.*, **22**, 1813 -1834.
- HÖLLDOBLER, B. & MICHENER, C. D. 1980. Mechanisms of identification and discrimination in social Hymenoptera In: *Evolution of social behavior: hypotheses and empirical tests* (Ed. by MARKL, H.), pp. 35-58. Weinheim: Verlag Chemie GmbH.
- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. 1990 *The Ants*. Cambridge: Harvard University Press.

- HOWARD, R. W., MCDANIEL, C. A., NELSON, D. R., BLOMQUIST, G. J., GELBAUM, L. T. & ZALKOW, L. H. 1982. Cuticular hydrocarbons of *Reticulitermes virginicus* (Banks) and their role as potential species- and caste-recognition cues *J. Chem. Ecol.*, **8**, 1227-1239.
- HUANG, Z. Y. & ROBINSON, G. E. 1992. Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **89**, 11726 -11729.
- HUANG, Z. Y. & ROBINSON, G. E. 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **39**, 147-158.
- HUANG, Z. Y., PLETTNER, E. & ROBINSON, G. E. 1998. Effects of social environment and worker mandibular glands on endocrine- mediated behavioral development in honey bees. *J. Comp. Physiol.*, **183**, 143 -152.
- INOUE, T., 1993. Kin recognition in social insects. In: *Evolution of Insect Societies* (Ed. By INOUE, T. & YAMANE S.), pp. 147–206. Tokyo: Hakuhin-sha.
- INOUE, T., ROUBIK, D. W. & SUKA, T. 1999. Nestmate recognition in the stingless bee *Melipona panamica* (Apidae, Meliponini). *Insectes Soc.*, **46**, 208-218.
- INOUE, T. & ROUBIK, D. W. 1990. Kin recognition of the stingless bee, *Melipona fasciata* In: *Social insects and the environment, Proceedings of the 11th international congress of IUSSI. IBH* (Ed. by VEERESH, G. K., MALLIK, B. & VIRAKTAMATH, C. A.), pp. 517-518. New Delhi.
- JAISSON, P. 1991. Kinship and fellowship in ants and social wasps. Kin Recognition (Ed. by HEPPER, P. G.), pp. 60-93. Cambridge University Press, Cambridge.
- JEANNE, R. L., WILLIAMS, N. M. & YANDEL, B. S. 1992. Age polyethism and defense in a tropical social wasp (Hymenoptera, Vespidae). *J. Insect Behav.*, **5**, 211-227.
- JUNGNICKEL, H., DA COSTA, A. J. S., TENTSCHERT, J., PATRICIO, E. L. R. A., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., DRIJFHOUT, F. & MORGAN, E. D. 2004. Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera, Apidae). *J. Insect Physiol.*, **50**, 761-766.
- LINDAUER, M. & KERR, W. E. 1960. Communication between the workers of stingless bees. *Bee World*, **41**, 29-41 & 65-71.
- KERR, W. E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, **35**, 143-152.
- LIEBERT, A. E. & STARKS, P. T. 2004. The action component of recognition systems: a focus on the response. *Ann. Zool. Fennici*, **41**, 747-764.

- LORENZI, M. C., COMETTA, I. & MARCHOSIO, G. 1999. Species and colony components in the recognition odor of young social wasp: their expression and learning (*Polistes biglumis* and *P. atrimandibularis*; Hymenoptera: Vespidae) *J. Insect Behav.*, **12**, 147-158.
- MATEO, J. M. 2004. Recognition systems and biological organization: The perception component of social recognition. *Ann. Zool. Fennici*, **41**, 729-745.
- MICHENER, C. D. 1974. *The Social Behavior of the Bees*. Cambridge: Harvard University Press.
- MICHENER, D. C. 2000. *The Bees of the World* Baltimore and London: Johns Hopkins University Press.
- MICHENER, C. D. & SMITH, B. H. Kin recognition in primitively eusocial insects. In: *Kin Recognition in Animals* (Ed. by FLETCHER D.J.C. & MICHENER, C.D.), pp. 209-242. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- MINTZER, A. & VINSON, S. B. 1985. Kinship and incompatibility between colonies of the acacia ant *Pseudomyrmex ferruginea*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **17**, 75-78.
- MOREL, L. & BLUM, M. S. 1988. Nestmate recognition in *Camponotus floridanus* callow worker ants: are sisters or nestmates recognized. *Anim. Behav.*, **36**, 718-725.
- MOREL, L., VAN DER MEER, R. K. & LAVINE, B. K. 1988. Ontogeny of nestmate recognition cues in the red carpenter ant (*Camponotus floridanus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **22**, 175-183.
- MORITZ, R. F. A. 1991. Kin recognition in honeybees: experimental artefact or biological reality? In: *The Behaviour and Physiology of Bees* (Ed. By Goodman L.J. & Fisher R.C.), pp. 48-59. Wallingford, UK: CEAEB International.
- NAGAMITSU, T. & INOUE, T. 1997. Aggressive foraging of social bees as a mechanism of floral resource partitioning in an Asian tropical rainforest. *Oecologia*, **110**, 432-439.
- NIEH, J. C., BARRETO, L. S., CONTRERA, F. A. L. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2004. Olfactory eavesdropping by a competitively foraging stingless bee, *Trigona spinipes*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **271**, 1633-1640
- NOGUEIRA-NETO, P. 1950. Notas bionômicas sobre meliponídeos (Hymenoptera, Apoidea). *Rev. Entom.*, **8**, 305-367.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1970. *A criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Ed. Chácaras e Quintais.
- PANEK, L., GAMBOA, G. J. & ESPELIE, K. E. 2001. The effect of a wasp's age on its cuticular hydrocarbon profile and its tolerance by nestmate and non-nestmate conspecifics (*Polistes fuscatus*, Hymenoptera: Vespidae). *Ethology*, **107**, 55-63.

- REEVE, H. K. 1989. The evolution of conspecific acceptance thresholds. *Am. Naturalist*, **133**, 407-435.
- ROUBIK, D. W. 1981. A natural mixed colony of *Melipona*. *J. Kansas Entomol. Soc.*, **54**, 263- 268.
- ROUBIK, D. W. 1989. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. New York: Cambridge University Press.
- SAKAGAMI, S. F. 1982. Stingless bees. In: *Social Insects* (Ed. by HERMANN, H. R.), pp. 361– 423. New York: Academic Press.
- SEELEY, T. D. 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociob.*, **11**, 287-293.
- SHERMAN, P. W., REEVE, H. K. & PFENNING, D. W. 1997. Recognition systems. In: *Behavioural Ecology* (Ed. by KREBS, J. R. & DAVIES, N. B.), pp. 69-96. Oxford: Blackwell Scientific Ltd.
- SHMID-HEMPEL, P. & SHMID-HEMPEL, R. 1984. Life duration and turnover of foragers in the ant *Cataglyphis bicolor* (Hymenoptera, Formicidae) *Insectes Soc.*, **31**, 345-360.
- SHOREY, H. H. 1973. Behavioral responses to insects pheromones. *Ann. Rev. Entomol.*, **18**, 349-380.
- SILVA, D. L. N. 1977. Estudos bionômicos em colônias mistas de Meliponinae. *Bol. Zool. Univ. São Paulo*, **2**, 7-106.
- SLAA, E. J., VAN NIEUWSTADT, M. G. L., PISA, L. W. & SOMMEIJER, M. J. 1997. Foraging strategies of stingless bees (Apidae, Meliponinae): the relation between precision of recruitment, competition and communication. *Acta Hort.*, **437**, 193–197
- SOMMEIJER, M. J. & BRUIJN, L. L. M. 1994. Intranidal feeding, trophallaxis, and sociality in stingless bees. In: *Nourishment and Evolution in Insect Societies* (Ed. by HUNT, J. & NALEPA, C.), pp. 391- 418. Oxford, UK: Westview Press.
- SOMMEIJER, M. J. 1984. Distribution of labour among workers of *Melipona favosa* (F): age polyethism and worker oviposition. *Insectes Soc.*, **31**, 171-184.
- STATISTICA. 2001. STATISTICA (data analysis software system) versão 6. STATSOFT Inc.
- STUART, R. J. 1987. Transient nestmate recognition cues contribute to a multicolonial population structure in the ant, *Leptothorax curvispinosus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **21**, 229-235.
- STUART, R. J., 1991. Kin recognition as a functional concept. *Anim Behav.*, **41**, 1093-1094

- STUART, R. J. 1992. Nestmate recognition and the ontogeny of acceptability in the ant, *Leptothorax curispinosus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **30**, 403 - 408.
- SUKA, T & INOUE, T. 1993. Nestmate recognition of the stingless bee *Trigona (Tetragonula) minangkabau* (Apidae: Meliponinae). *J. Ethol.*, **11**, 141–147.
- SUKA, T., INOUE, T. & ROUBIK, D. W. 1994 Worker oviposition and kin recognition of the stingless bee *Scaptotrigona barrocoloradensis*. In: *Les Insectes Sociaux* (Ed. by LENOIR, A., ARNOLD, G. & LEPAGE, M.), pp. 338. Paris: Université Paris Nord.
- TOFILSKI, A. 2002. Influence of age polyethism on longevity of workers in social insects. *Behav Ecol. Sociob.*, **51** 234-237.
- VENKATARAMAN, A. B. & GADAGKAR, R. 1993. Differential aggression towards alien conspecifics in a primitively eocial wasp. *Curr. Science*, **64**, 601-604.
- WAGNER, D., BROWN, M. J. F., BROUN, P., CUEVAS, W., MOSES, L. E., CHAO, D. L. & GORDON, D. M. 1998. Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus* *J. Chem. Ecol.*, **12**, 2021-2037.
- WILSON, E. O. 1963. Pheromones. *Sci. Am.*, **208**, 100-104
- WITTMANN, D. 1985. Aerial defense of the nest by workers of the stingless bee *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **16**, 111–114
- WITTMANN, D., RADTKE, R., ZEIL, J., LUBKE, G. & FRANCKE, W. 1990. Robber bees (*Lestrimelitta limao*) and their host chemical and visual cues in nest defense by *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Apidae, Meliponinae). *J. Chem. Ecol.*, **16**, 631– 641



**3. CAPITULO II:
INFLUÊNCIA DA IDADE DE RAINHAS VIRGENS E DO STATUS
COMPORTAMENTAL DAS OPERÁRIAS SOBRE O PROCESSO DE
ACEITAÇÃO DE RAINHAS EM *Melipona quadrifasciata* Lep.
(HYMENOPTERA: MELIPONINI)**

3.1. INTRODUÇÃO

A eussocialidade é caracterizada pelo trabalho cooperativo no cuidado com as crias, sobreposição de pelo menos duas gerações de adultos e divisão reprodutiva de trabalho (WILSON, 1971; MICHENER, 1974; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). Esta divisão reprodutiva de trabalho é manifestada pela ocorrência de duas castas de fêmeas (rainha e operária), distintas morfológica e/ou comportamentalmente (WILSON, 1971; MICHENER, 1974; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Em muitas abelhas altamente eussociais, o tipo e/ou quantidade de alimento oferecido à larva constitui o fator exógeno dominante que vai determinar se uma larva se desenvolve em rainha ou operária (HARTFELDER, 1990). Na tribo Meliponini, mais particularmente no gênero *Melipona*, rainhas, machos e operárias se originam de células de cria de mesmo tamanho, o que indica que estas abelhas ingerem quantidades similares de alimento (KERR, 1950; MICHENER, 2000). Vários trabalhos sugerem que a diferenciação de castas no gênero *Melipona* é determinada geneticamente, embora, fatores ambientais e quantidade de alimento possam influenciar este processo (KERR et al., 1966; CAMARGO, 1976; VELTHUIS & SOMMEIJER, 1991).

Na tribo Meliponini, rainhas virgens são produzidas regularmente ao longo do ano (IMPERATRIZ-FONSECA, 1978; ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; VAN VEEN et al., 1992; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995). Estas rainhas podem enxamear com operárias e fundar um novo ninho, assumir o posto de rainha em colônias órfãs ou substituir uma rainha dominante pouco produtiva (SILVA et al., 1972; MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; KLEINERT-GIOVANINI, 1989; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995). Contudo, rainhas virgens excedentes são mortas por operárias antes de serem aceitas como rainhas e partem para o vôo nupcial (SILVA et al., 1972; MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995). Embora SILVA et al. (1972) relatem que, em *M. quadrifasciata*, rainhas virgens recentemente aceitas ajudem operárias a eliminar outras rainhas que venham a emergir na colônia, normalmente esta tarefa é executada por operárias. No entanto, em certos casos, rainha virgens são toleradas vivas dentro das colônias por tempo variado. Em algumas espécies de *Trigona*, jovens rainhas virgens

são aprisionadas em câmaras feitas de cera e resina, onde permanecem temporariamente, até que seu destino seja definido (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995). Em *Melipona*, rainhas virgens conseguem permanecer vivas durante algum tempo, refugiando-se entre as camadas do invólucro ou dentro de potes de alimento vazios (KLEINERT & IMPERATRIZ-FONSECA, 1994).

A produção de rainhas no gênero *Melipona* varia de 12 a 25% (KERR & NIELSEN, 1966). Em colônias com rainha fecundada, todas as rainhas virgens são mortas. Já em orfandade, uma das rainhas virgens é escolhida em detrimento das outras, realizando mais tarde, o vôo nupcial (CAMARGO, 1976; KERR, 1978). Com base nestas informações, ROUBIK (1989) sugere que o excesso de rainhas virgens produzidas, além de serem disponibilizadas para a substituição da rainha mãe ou fundação de uma nova colônia, pode estar sendo utilizado para a seleção de um genótipo particular de rainha pelas operárias ou por outros agentes. KOEDAM et al. (1995a) conjecturam que existe uma competição entre rainhas não inseminadas e a rainha fisogástrica, sendo esta competição uma forma de garantir a constante qualidade da rainha fisogástrica, e deste modo, a manutenção da colônia.

Os mecanismos pelos quais as rainhas virgens em Meliponini são aceitas ou rejeitadas ainda permanecem obscuros, embora alguns pesquisadores relatem que feromônios liberados por glândulas abdominais, as quais são expostas quando o abdômen das rainhas virgens se alarga, possam influenciar tal decisão (KOEDAM et al., 1995b; ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995). SILVA et al. (1972) encontraram em colônias de *M. quadrifasciata* 68,4% de rainhas virgens mortas após um dia de emergência, durante o período de orfandade, enquanto que rainhas virgens, em colônias com rainhas fisogástricas, foram mortas num período de dois a dez dias. Para *M. quinquefasciata*, após um período de orfandade induzida, assinalaram 100% de mortes dentro de um dia após a emergência. Resultados semelhantes para mortalidade de rainhas recentemente emergidas foram encontrados em colônias de *M. favosa*, com rainha fisogástrica (KOEDAM et al., 1995a) e em colônias de *M. beechei*, em orfandade (VAN VEEN et al., 1999). A aceitação de rainhas virgens pode ocorrer em poucas horas ou até semanas após a emergência. Alguns fatores têm sido indicados como responsáveis por esta variação, tais como as condições da colônia e a fecundidade da rainha (KOEDAM et al., 1995a;

SILVA et al., 1972; IMPERATRIZ-FONSECA, 1978; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995; VAN VEEN et al., 1999).

Embora a maior parte dos trabalhos sobre aceitação de rainhas enfoquem comportamento agonístico entre operárias e rainhas virgens, bem como a provável influência de seus feromônios, pouco é conhecido sobre a faixa etária e/ou tarefa desenvolvida pelas operárias durante aquelas interações. Outro aspecto importante a ser apreciado, está relacionado com a influência da idade das rainhas virgens no processo de aceitação pelas operárias. KOEDAM et al. (1995a) sugerem que a agressividade das operárias na direção das rainhas virgens, bem como, o risco destas serem mortas, aumenta quando as rainhas virgens se tornam mais velhas. CAMARGO (1976) introduziu rainhas inseminadas de *M. quadrifasciata* em colônias formadas por operárias recém-emergidas sem que estas apresentassem qualquer comportamento agressivo na direção destas rainhas.

Neste trabalho, testamos a hipótese de que interações agonísticas entre rainhas virgens e operárias de *M. quadrifasciata*, são influenciadas pela idade das rainhas virgens e pelo status comportamental das operárias durante a introdução.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

As abelhas utilizadas no experimento foram obtidas de quatro colônias de *M. quadrifasciata anthidioides*, mantidas no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, durante os meses de outubro e novembro 2002.

3.2.1. Coleta de rainhas para os ensaios

Rainhas recém emergidas foram obtidas de discos de cria mantidos em estufa BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a emergência, cada rainha foi transferida para uma placa de Petri juntamente com 5 operárias jovens, mais pólen e mel, até a sua utilização nos experimentos (modificado de CAMARGO, 1976). Rainhas de 0 dia foram utilizadas imediatamente após a emergência.

3.2.2. Coleta de operárias e montagem de mini-colônias

As operárias foram coletadas diretamente de suas colônias de origem. Operárias forrageiras foram coletadas com rede entomológica quando retornavam das atividades de coleta. As operárias nutridoras foram capturadas na área destinada aos discos de cria, identificadas de acordo com o padrão de coloração característico (FAGUNDES et al., 2006). Foram formadas dois tipos de colônias órfãs, uma constituída por operárias forrageiras e outra por operárias nutridoras, cada uma com 30 indivíduos. Estas colônias foram acondicionadas em duas caixas de madeira (15 X 15 X 6 cm), contendo 1 pote pólen e mel fornecido *ad libitum*. Estas mini-colônias foram mantidas em estufa BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo retiradas só para os ensaios e manutenção.

3.2.3. Bioensaios de aceitação de rainhas virgens

Foram realizados dois ensaios, um para a colônia órfã constituída por operárias forrageiras e a outra para colônia órfã constituída por operárias nutridoras. Em cada colônia foram introduzidas 40 rainhas virgens, sendo 10 para cada tratamento (rainhas de **0, 1, 2, e 3** dias de idade), totalizando 80 rainhas. As rainhas virgens foram liberadas, uma por vez, obedecendo a intervalos de, no mínimo, 15min. para que se procedesse uma outra repetição. Este intervalo variou de acordo com a disponibilidade de rainhas virgens para cada tratamento. As interações entre as rainhas virgens e operárias foram observadas durante 10 min., sendo a quantidade de rainhas aceitas e rejeitadas em cada ensaio anotada. Foi considerada aceita, a rainha que, durante o período de observação, mostrou repertório comportamental peculiar, tais como: abdômen inflado, movimentos de giro e guinadas bruscas na direção das operárias, sem que estas chegassem a promover ataques que resultassem na morte ou injúria da rainha testada. Foi considerada rejeitada, a rainha perseguida, agredida e/ou morta. Os ensaios foram, na medida do possível, filmadas e fotografados.

Os resultados foram avaliados através da Regressão logística, com aceitação como variável dependente e tempo (em dias) como variável independente contínua. A significância do modelo, bem como a independência das variáveis foram testadas pelo teste de Qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises foram feitas usando o programa *Statistica 6.0* (Statsoft Inc.2001)

3.3. RESULTADOS

O teste do Qui-quadrado mostrou diferenças significativas (c^2 19,708; $p=$ 00001, $gl(1)$), entre o modelo de Regressão logística restrito (estimado somente com a constante) e o modelo completo. O modelo de regressão logística estimou corretamente 92,8% das rejeições (26 para os 28 da amostra) (**Tabela 4**). Observa-se também que, dos 12 casos de aceitação presentes na amostra, 8 foram estimados corretamente pelo modelo, o que equivale a 66,6%. Portanto, o modelo de Regressão logística conseguiu, no total, estimar corretamente 85% das observações amostrais ($N= 40$). A Regressão logística (**Figura 5**) mostrou que a aceitação de rainhas virgens diminui com a idade, quando estas são introduzidas em mini-colônia constituída com operárias forrageiras. Neste tratamento, 80% das rainhas virgens de 0 dia de idade foram aceitas, enquanto que, rainhas virgens de três dias foram todas mortas (**Tabela 5**). Já, em mini-colônias com população constituída por operárias nutridoras, embora tenha ocorrido um aumento da rejeição de rainhas virgens de três dias de idade, não ocorreu uma diferenciação notável quanto ao número de rainhas rejeitadas, se comparado com rainhas virgens de 0, 1 e 2 dias de idade (**Tabela 6**). Neste ensaio, o modelo de Regressão logístico não foi significativo ($c^2=$ 1,8759; $p=$,17081, $gl(1)$), indicando, portanto, que a aceitação de rainhas virgens em mini-colônias desta classe comportamental não é influenciada pela idade (**Figura 6**)

Tabela 4- Valores observados e estimados em encontros agonísticos entre rainhas virgens e operárias forrageiras de *M. quadrifasciata* em mini-colônias órfãs estimados pelo modelo de Regressão logística.

Observado	Estimado		Percentual correto
	Rejeição	Aceitação	
Rejeição	26	2	92,8%
Aceitação	4	8	66,6%
Total			85%

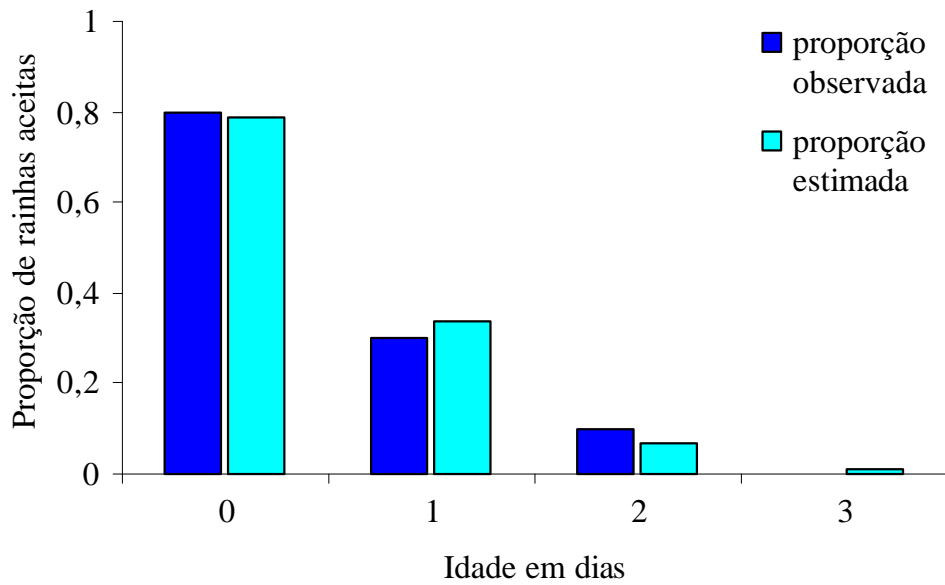


Fig 5– Gráfico de regressão logística da proporção de rainhas virgens de *M. quadrifasciata* aceitas por operárias forrageiras, em função da idade.

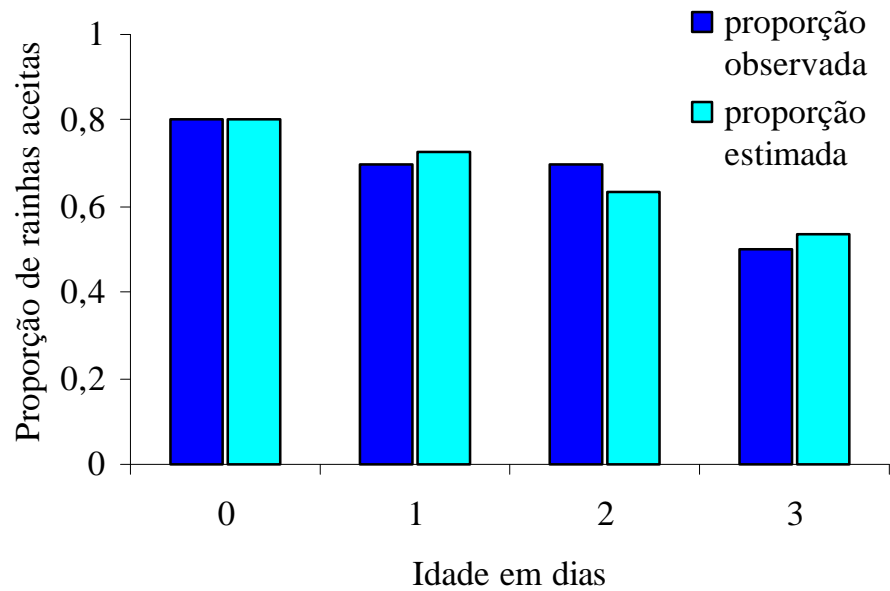


Fig. 6– Gráfico de regressão logística da proporção de rainhas virgens de *M. quadrifasciata* aceitas por operárias nutridoras, em função da idade.

Tabela 5- Quantidade de rainhas virgens aceitas e rejeitadas de acordo com a idade, em colônia órfã constituída por operárias forrageiras.

Repetição	Idade em dias				Total
	0	1	2	3	
1	aceita	aceita	rejeitada	rejeitada	
2	aceita	rejeitada	rejeitada	rejeitada	
3	rejeitada	rejeitada	rejeitada	rejeitada	
4	aceita	rejeitada	aceita	rejeitada	
5	aceita	aceita	rejeitada	rejeitada	
6	aceita	rejeitada	rejeitada	rejeitada	
7	aceita	aceita	rejeitada	rejeitada	
8	aceita	rejeitada	rejeitada	rejeitada	
9	aceita	rejeitada	rejeitada	rejeitada	
10	rejeitada	rejeitada	rejeitada	rejeitada	
Aceita	80%	30%	10%	0%	12
Rejeitada	20%	70%	90%	100%	28
Total geral	100%	100%	100%	100%	40

Tabela 6- Quantidade de rainhas virgens aceitas e rejeitadas de acordo com a idade, em colônia órfã constituída por operárias nutridoras.

Repetição	Idade em dias				Total
	0	1	2	3	
1	aceita	rejeitada	aceita	rejeitada	
2	aceita	aceita	aceita	0	
3	aceita	aceita	aceita	aceita	
4	aceita	aceita	aceita	aceita	
5	aceita	aceita	aceita	aceita	
6	rejeitada	rejeitada	rejeitada	aceita	
7	aceita	rejeitada	rejeitada	aceita	
8	aceita	aceita	rejeitada	rejeitada	
9	aceita	aceita	aceita	rejeitada	
10	rejeitada	aceita	aceita	rejeitada	
Aceita	80%	70%	70%	50%	27
Rejeitada	20%	30%	30%	50%	13
Total geral	100%	100%	100%	100%	40

3.3.1. Descrição das interações entre operárias e rainha durante a introdução de rainhas virgens

O comportamento das rainhas virgens recém-emergidas (**0 dia**) em mini-colônias constituídas com operárias forrageiras foi o seguinte: ao serem introduzidas, estas caminhavam apressadas pelo assoalho da caixa e por entre os potes de alimento sem serem molestadas. No entanto, contatos antenais ou troca de alimento líquido (trofaláxia) foram inexistentes. Não houve formação de corte, embora algumas rainhas virgens apresentassem comportamento característico, inflando o abdômen e fazendo movimentos circulares, girando sobre o próprio eixo, às vezes em sentido horário, noutras em sentido anti-horário, esfregando as pernas traseiras e medianas umas sobre as outras e sobre as partes laterais do abdômen. Outro comportamento comum nestas ocasiões foi a constante solicitação de alimento, com bruscas guinadas e recuos, numa manifestação peculiar de dominância-subordinação. Já, as rainhas virgens de um dia de idade foram percebidas mais rapidamente. Ao tentar impor a sua dominância exibindo comportamento agonístico, com movimentos de ataque e recuo, abdômen inflado, foram perseguidas, atacadas e mortas em **80%** dos casos. Rainhas virgens de dois e três dias de idade foram atacadas e mortas, em respectivamente **90%** e **100%** dos casos (**Tabela 5**)

Na colônia constituída por operárias nutridoras, o comportamento observado foi oposto ao do tratamento anterior. Nestas colônias, independente da idade das rainhas virgens, houve formação de corte por parte das operárias nutridoras (**Figura 7**). Durante estas interações as rainhas virgens exibiram comportamento característico, com abdômen inflado, movimentos circulares, giros sobre o próprio eixo, às vezes em sentido horário, noutras em sentido anti-horário, esfregando as pernas traseiras e medianas umas sobre as outras e sobre as partes laterais do abdômen. Conforme ocorrido no tratamento anterior, as operárias nutridoras se lançavam bruscamente na direção da rainha, com movimentos de avanço e recuo, numa manifestação peculiar de dominância-subordinação. Fato importante nos encontros entre rainhas virgens e operárias nutridoras foi a ocorrência de interações trofaláticas durante as cortes formadas (**Figura 8**). No entanto, estas interações ocorreram entre a rainha virgem e, no máximo, duas operárias da corte e sempre por coação.



Fig. 8- Corte entre operárias nutridoras e rainha virgem de um dia de idade.



Fig. 9- Interação trofalática entre rainha virgem de dois dias de idade e operária nutridora.

3.4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, o comportamento agonístico de operárias em relação às rainhas virgens foi claramente dependente da idade, quando estas foram confrontadas com operárias forrageiras. No entanto, os resultados foram categoricamente diferentes quando as rainhas virgens foram confrontadas com operárias nutridoras.

KOEDAN et al. (1995a), em trabalho feito em colônias normais (com rainha fisogástrica) de *Melipona favosa*, revela que, em geral, o risco de rainhas virgens serem mortas aumenta com a idade. Contudo, segundo estes autores, a morte simultânea de rainhas virgens de idades diferentes sugere que outros fatores possam estar envolvidos.

Alguns trabalhos têm sugerido que feromônios estejam envolvidos no processo de aceitação de rainhas em Meliponini (ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; CRUZ-LANDIM & MOTA, 1990; KLEINERT & IMPERATRIZ-FONSECA, 1994; KOEDAM et al., 1995a, 1995b; VAN VEEN et al., 1999). Os resultados do presente estudo suportam parcialmente esta hipótese. No entanto, não é descartado que estes feromônios atuem de forma sinérgica com as manifestação de comportamento ritualizado (ZUCCHI, 1993).

Sugerimos, então, uma hipótese alternativa, na qual assumimos que os feromônios produzidos pelas glândulas abdominais das rainhas, em Meliponini, afetam o comportamento das operárias de forma diferenciada. De acordo com esta hipótese, o comportamento das operárias depende do tipo de tarefa na qual estejam engajadas no momento do encontro com as rainhas virgens e, devido à baixa volatilidade deste feromônio, sua ação se restringiria às proximidades da rainha. Portanto, havendo a necessidade de contatos de partes do corpo da rainha e das operárias para que a dominância social seja consolidada. Isto, em parte, pode explicar a manutenção da dominância ritualizada neste taxa. Baixos voláteis, dentre estes, os hidrocarbonetos cuticulares (**HCS**), são prováveis candidatos a esta função. ABDALLA et al. (2003) em trabalho desenvolvido com *M. bicolor*, encontraram uma variação na composição de **HCS** nas castas de fêmeas. A composição de **HCS** de rainhas virgens diferiram das encontradas para rainhas fisogástricas, bem como, entre operárias de diferentes grupos de tarefas. Embora existam indicações de que rainhas virgens do gênero *Melipona*, normalmente nasçam sem “atratividade” (IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI,

1995), no presente trabalho muitas rainhas virgens recém-emergidas exibiram repertório comportamental idêntico ao encontrado para rainhas virgens mais velhas, sendo percebidas imediatamente pelas operárias. Isto corrobora com observações de KOEDAM et al.(1995b), de que a habilidade de inflar o abdômen não tem relação com a idade das rainhas virgens ou com a atratividade. Por outro lado, ABDALLA et al. (2003) encontraram semelhanças entre HCs de rainhas e operárias recém-emergidas em *M. bicolor*. Colônias de Meliponini são tolerantes com operárias recém-emergidas mesmo que estas não compartilhem da mesma origem (NOGUEIRA-NETO, 1950; MICHENER, 1974; SILVA, 1977; ROUBIK, 1981; ROUBIK, 1989; INOUE et al., 1999), o que pode explicar a tolerância de operárias forrageiras às rainhas virgens de 0 dia de idade por nós observada.

As mini-colônias utilizadas no presente estudo, embora facilite o reconhecimento das rainhas virgens pelas operárias, devido à redução de área, certamente não influencia o processo de aceitação, visto que, rainhas de diferentes idades submetidas à mesma metodologia desencadearam reações diferentes nas operárias. Contudo, a introdução de uma rainha virgem por vez, pode ter eliminado a competição, que certamente ocorreria, caso outras rainhas virgens e uma rainha fisogástrica estivessem presentes na colônia. SILVA et al. (1972) registraram a participação de uma rainha recentemente aceita em ataques a outras rainhas virgens, numa colônia de *M. quadrifasciata* em processo de substituição natural. KOEDAM et al. (1995a) argumentam que existe uma competição reprodutiva entre a rainha fisogástrica e as rainhas virgens de *M. favosa*, já que estas estão predestinadas a tornarem-se reprodutivas. Estes mesmos autores sugerem que as operárias atuam como controladoras, sendo capazes de avaliar a qualidade reprodutiva da rainha dominante e das rainhas virgens constantemente produzidas na colônia.

A ausência de interações trofaláticas entre rainhas virgens e operárias forrageiras observadas no presente estudo, sugere que estas operárias possuem restrições de ordem comportamental e fisiológica. Operárias forrageiras possuem glândulas hipofaríngeas atrofiadas (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; FAGUNDES et al., 2006), que produzem principalmente invertase, enzima envolvida na conversão de néctar em mel, necessários para a realização dos longos vôos de coleta (SIMPSON, 1968; ARNOLD & DALAGE-DARCHEN, 1978). Operárias nutridoras, por sua vez, possuem glândulas hipofaríngeas bem desenvolvidas (BEGO, 1974, 1983; COSTA-LEONARDO, 1982; KNECHT & KAATS, 1990; COSTA & CRUZ-

LANDIM, 1999; FAGUNDES et al., 2006), necessárias para a produção de secreção glandular protéica, importante para a manutenção do *status* reprodutivo da rainha e desenvolvimento das crias (SOMMEIJER et al., 1985; SOMMEIJER & BRUIJN, 1994). Isto explica o por quê do maior número de interações trofaláticas observadas em cortes formadas por rainhas virgens e operárias nutridoras, em comparação ao observado entre rainhas virgens e operárias forrageiras. Contudo, embora interações trofaláticas entre rainhas e operárias nutridoras sejam mais freqüentes, em abelhas sem ferrão, estas nunca são trofalaticamente alimentadas de forma espontânea (SOMMEIJER & BRUIJN, 1994).

Trabalhos realizados com o gênero *Melipona* demonstram que rainhas fisogástricas são sempre aceitas em colônias estranhas da mesma espécie (SAKAGAMI et al., 1965; NOGUEIRA-NETO, 1970; CAMARGO, 1976; MONTEIRO DE ANDRADE, 1988). Esse fato sugere que a atuação feromonal em rainhas fisogástricas é mais eficiente. No entanto, em rainhas virgens, a sua aceitação depende do *status* fisiológico, bem como, *status* comportamental das operárias, o que pode torná-las, mais ou menos susceptíveis ao processo de aceitação. Em trabalho realizado com *M. bicolor*, ABDALLA et al. (2004) constataram que a secreção da glândula de Dufour de rainhas virgens consiste principalmente de hidrocarbonetos, enquanto que a secreção da glândula de Dufour de rainhas fisogástricas contém, além de hidrocarbonetos, uma variedade de outros compostos. De acordo com estes autores, além de indicar o estado de fecundidade da rainha, os compostos oxigenados da secreção da glândula de Dufour podem ajudar a aumentar a sua atratividade.

Em suma, embora possa haver o envolvimento de feromônios no processo de aceitação de rainhas virgens, estes são pouco eficientes, sendo necessário, portanto, a manifestação do comportamento de dominância ritualizada para que uma rainha virgem seja efetivamente aceita pelas operárias. Nós também sugerimos que estes feromônios influenciam operárias de forma diferenciada, já que, a regressão logística não indica uma relação entre a idade das rainhas virgens e a sua aceitação, quando estas foram introduzidas em mini-colônias compostas por operárias nutridoras, embora, haja uma pequena redução da aceitação quando se compara rainhas de 0 a 3 dias de idade. Isso sugere que operárias nutridoras podem tolerar rainhas virgens até uma certa idade, quando sua identificação se torna possível, sendo então, expulsas da área de cria e eliminada pelas operárias.

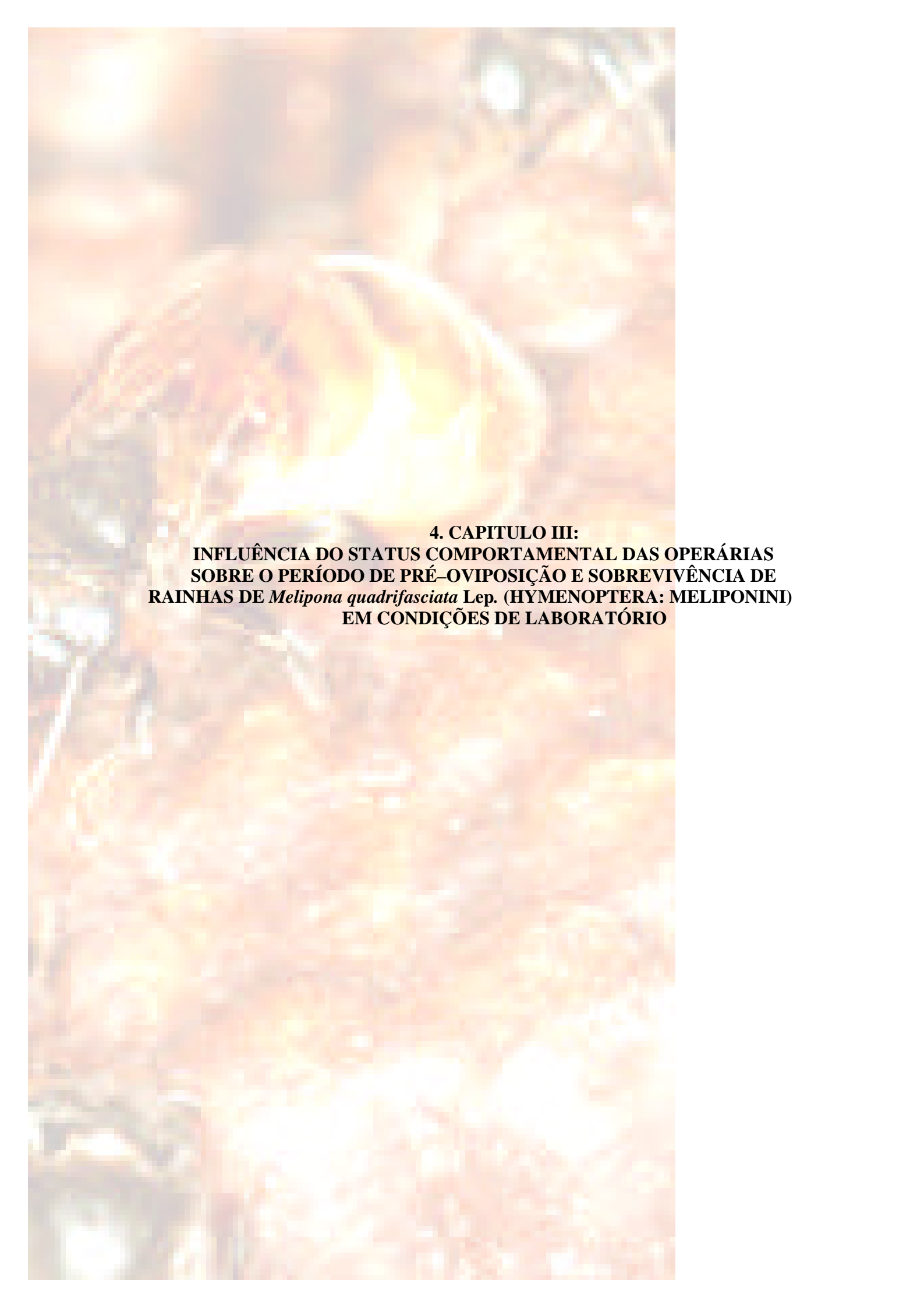
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABDALLA, F. C., JONES, G. R., MORGAN, D. & CRUZ-LANDIM, C. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Gen. Molec. Res.*, **2**, 191-199.
- ABDALLA, F. C., JONES, G. R., MORGAN, D. & CRUZ-LANDIM, C. 2004. Chemical composition of the Dufour Gland secretion in queens of *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). *J. Braz. Chem. Soc.*, **5**, 621-625.
- ARNOLD, G. & DALAGE-DARCHEN, B. 1978. Nouvelles donnés sur l'équipapement enzymatique des glandes salivaires de 11 ouvrière de *Apis mellifica* (Hyménoptère, Apidé). *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.*, **20**, 401-422.
- BEGO, L. R. 1974. Estudos sobre a regulação social em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille com especial referência a aspectos morfo-funcionais (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP (Dissertação de Ms.).
- BEGO, L. R. 1983. On some aspects of bionomics in *Melipona bicolor* Lep. (Hymenoptera Apidae, Meliponinae) *Rev. Bras. Entom.*, **27**, 211-224.
- CAMARGO, C. A. 1976. Determinação do sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP (Tese de D.S.).
- COSTA, R. A. C. & CRUZ-LANDIM, C. 1999. Occurrence and morphometry of the hypopharyngeal gland in *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Netherl. Journ. Zool.*, **49**, 157-166.
- COSTA-LEONARDO, A. M. 1982. Ciclo de desenvolvimento das glândulas mandibulares de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) e a regulação social na colônia. São Paulo-SP: Instituto de Biociências-USP (Tese de D.S.).
- CRUZ-LANDIM, C. & HADEK, R. 1969. Ultrastructure of *Apis mellifera* hypopharyngeal gland. In: *Proc. VI Congr. IUSSI*, pp. 121-130. Bern.
- CRUZ-LANDIM, C. & MOTA, M. H. V. B. 1990. Occurrence of tegumentary glands in stingless bee (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: *Social Insect and the Environment* (Ed. by VEERESH, G. K., MALLIK, B. & VIRAKTAMAH, C. A.), pp. 587. Bombay, India: Oxford & IBH Publishing Co.

- ENGELS, W. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: *Social Insects, an Evolutionary Approach to Castes and Reproduction* (Ed. by ENGELS, W.), pp. 167-230. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- FAGUNDES, I. B., SERRÃO, J. E. & CAMPOS, L. A. O. 2006. Tergite pigmentation indicate hypopharyngeal gland developmental degree in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, **48**, 1-12
- HARTFELDER, K. 1990 Regulatory steps in caste development of eusocial bees. In: *"Social Insects: an evolutionary approach to castes and reproduction"* (Ed. by ENGELS, W.), pp. 245-264. New York: Springer, Berlin Heidelberg.
- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. 1990. *The Ants*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1978. Studies on *Paratrigona subnuda* (Moure) (Hymenoptera, Apidae Meliponinae) III. Queen supersedure. *Bol. Zool. Univ. São Paulo*, **3**, 153-162.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & ZUCCHI, R. 1995 Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review *Apidologie*, **26**, 231-244.
- INOUE, T., ROUBIK, D. W. & SUKA, T. 1999. Nestmate recognition in the stingless bee *Melipona panamica* (Apidae, Meliponini). *Insectes Soc.*, **46**, 208-218.
- KERR, W. E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, **35**, 143-152.
- KERR, W. E. 1978. Papel das abelhas sociais na Amazônia. In: *Apimondia Int. Symp. on Apiculture in Hot Climates*, pp. 119-129. Florianópolis-SC, Brazil.
- KERR, W. E. & NIELSEN, R. A. 1966. Evidences that genetically determined *Melipona* queens can become workers. *Genetics*, **54**, 859-866.
- KERR, W. E., STORT, A. C. & MONTENEGRO, M. J. 1966. Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas do gênero *Melipona*. *An. Acad. Bras. Cien.*, **38**, 149-168.
- KLEINERT, A. M. P. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1994. Virgin queens refuges in colonies of *Melipona marginata* (Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Biol.*, **54**, 247-251.
- KLEINERT-GIOVANINI, A. 1989. Mecanismos de controle reprodutivo em *Melipona marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae) In: *Instituto de Biologia*. São Paulo-SP: USP.
- KNECHT, D. & KAATZ, H. H. 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie*, **21**, 457-468.

- KOEDAM, D., AARTS, T. & SOMMEIJER, M. J. 1995b. Queen acceptance in *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae): Morphological changes and behavioral development of virgin queen. In: *Behavioural and physiological implications of queen dominance in stingless bees*, pp. 83-100. Netherlands: Uversiteit Utrecht.
- KOEDAM, D., MONGE, A. I. & SOMMEIJER, M. J. 1995a. Social interactions of rainhas virgens and their longevity in queenright colonies of *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae). *Neth. J. Zool.*, **45**, 480-494.
- MICHENER, C. D. 1974. *The Social Behavior of the Bees*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- MICHENER, C. D. 2000. *The Bees of the World*. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press.
- MONTEIRO DE ANDRADE, C. 1988. Permuta de rainhas em *Melipona compressipes fasciculata* e sua importância no melhoramento. Maranhão-MA: Universidade Federal do Maranhão (Monografia).
- NOGUEIRA-NETO, P. 1950. Notas bionômicas sobre meliponídeos (Hymenoptera, Apoidea). *Rev. Entomol.*, **8**, 305-367.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1970. *A Criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)*. São Paulo: Chácaras e Quintais.
- ROUBIK, D. W. 1981. A natural mixed colony of *Melipona*. *J. Kansas Entomol. Soc.*, **54**, 263-268.
- ROUBIK, D. W. 1989. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. New York: Cambridge University Press
- SAKAGAMI, S. F. 1982. Stingless Bees. In: *Social Insects* (Ed. by Hermann, H. R.), pp. 361-423. New York: Academic Press.
- SAKAGAMI, S. F., MONTENEGRO, M. J. & KERR, W. E. 1965. Behavior studies of the stingless bee, with special reference to the oviposition process. V. *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier. *J. Fac. Sci. Hokkaido University*, **15**, 578-607.
- SILVA, D. L. N. 1977. Estudos bionômicos em colônias mistas de Meliponinae. *Bol. Zool. Univ. São Paulo*, **2**, 7-106.
- SILVA, L. N. S., ZUCCHI, R. & KERR, W. E. 1972. Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Anim. Behaviour*, **20**, 123-132.
- SIMPSON, J., RIEDEL, I. B. M. & WILDING, N. 1968. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *J. Apic. Res.*, **7**, 29-36.

- SOMMEIJER, M. J. & BRUIJN, L. L. M. 1994. Intranidal feeding, trophallaxis, and sociality in stingless bees. In: *Nourishment and Evolution in Insect Societies* (Ed. by HUNT, J. & NALEPA, C.), pp. 391-418. Oxford, UK: Westview Press.
- SOMMEIJER, M. J., DE BRUIJN, L. L. M. & VAN DE GUCHTE, C. 1985. The social food-flow within the colony of a stingless bee, *Melipona favosa* (F.). *Behaviour*, **92**, 39-58.
- STATISTICA. 2001. STATISTICA (data analysis software system) versão 6. STATSOFT Inc.
- TERADA, Y. 1974. Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP (Dissertação de Ms.).
- VAN VEEN, J. W., KOEDAM, D., SOMMEIJER, M. J. & MONGE, A. I. 1992. Behaviour of virgin queens in stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: *Resúmenes del I Congreso Centroamericano de Entomología y Combate Natural de Plagas; II Congreso Costarricense de Entomología*, pp. 8. San José, Costa Rica.
- VAN VEEN, J. W., SOMMEIJER, M. J. & MONGE, A. I. 1999. Behavioural development and abdomen inflation of rainhas virgens and newly mated queens of *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Soc.*, **46**, 361-365.
- VELTHUIS, H. H. W. & SOMMEIJER, M. J. 1991. Roles of morphogenetic hormones in caste polymorphism in stingless bees. In: *Morphogenetic Hormones of Arthropoda* (Ed. by GUPTA, A. P.), pp. 346-383. New Brunswick, New Jersey: Rutgers University Press.
- WILSON, E. O. 1971. *The insect societies*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- ZUCCHI, R. 1993. Ritualised dominance, evolution of queen-worker interactions and related aspects in stingless bees (Hymenoptera: Apidae). In: *Evolution of Insect Societies* (Ed. by INOUE, T. & YAMANEE, S.), pp. 207-249. Tokyo: Hakuhinsha Publishing Co.



**4. CAPITULO III:
INFLUÊNCIA DO STATUS COMPORTAMENTAL DAS OPERÁRIAS
SOBRE O PERÍODO DE PRÉ-OVIPOSIÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE
RAINHAS DE *Melipona quadrifasciata* Lep. (HYMENOPTERA: MELIPONINI)
EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO**

4.1. INTRODUÇÃO

Operárias em colônias de insetos eussociais frequentemente manifestam uma divisão de trabalho altamente organizada, particularmente naquelas espécies onde a população de adultos alcança ou excede muitas centenas de indivíduos (WILSON, 1971). A divisão de trabalho entre operárias está associada com diferenças na idade das operárias (KERR & SANTOS NETO, 1956; MICHENER, 1974; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990; ROBINSON, 1992), genótipo (PAGE & ROBINSON, 1991; PAGE et al., 1992; MORITZ & SOUTHWICK, 1993; RANGER & O'DONNELL, 1999; BEN-SHAHAR et al., 2002) e morfologia (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990)

A divisão de trabalho relacionado com a idade, padrão referido como polietismo etário, é mais pronunciada em vespas e abelhas eussociais, enquanto que a divisão de trabalho baseado em diferenciação morfológica é mais proeminente em formigas e termitas (WILSON, 1971; MICHENER, 1974; OSTER & WILSON, 1978). Nas colônias de abelhas das tribos Apini e Meliponini operárias desenvolvem padrões comportamentais estereotipados. Operárias de *Apis mellifera* realizam tarefas intranidais durante a primeira e segunda semana da vida adulta, tais como: cuidado com as crias, armazenamento de alimento e manutenção do ninho e, da quinta à sétima semana realizam tarefas de coleta e proteção do ninho, permanecendo nestas atividades durante o restante de suas vidas (WINSTON, 1987). Conforme KERR & SANTOS NETO (1956), operárias de *Melipona quadrifasciata* realizam tarefas intranidais do primeiro ao vigésimo sétimo dia, tais como: construção de invólucro, incubação de células de cria, construção de pilastras, mordiscam e destroem favos de cria velhos, constroem potes de alimento, trabalham com lixo, aprovisionamento, operculação, propolização e recepção de néctar. Do vigésimo sétimo ao trigésimo oitavo dia realizam tarefas extranidais, tais como: forrageamento de néctar, resina e pólen.

Embora quase todas as operárias sigam a seqüência acima descrita, a taxa de polietismo etário entre os companheiros de ninho pode variar bastante, existindo grande plasticidade nestes padrões comportamentais (SAKAGAMI, 1982; KOLMES & SOMMEIJER, 1992a, 1992b). Em resposta a mudanças ambientais, densidade demográfica e necessidade das colônias, operárias de abelhas eussociais podem acelerar,

retardar ou reverter padrões de desenvolvimento comportamental (BEGO, 1974; ROBINSON, 1992; WALDSCHMIDT, 1995; HUANG & ROBINSON, 1996, 1992).

Em todas as colônias de abelhas da tribo Meliponini, as atividades dentro do ninho são temporalmente organizadas em torno da oviposição pela rainha, assistida por operárias nutridoras. Meliponini e Apini diferenciam-se de forma notável quanto ao cuidado com as crias. Nos Apini a rainha coloca seus ovos em células vazias e logo após a eclosão as larvas são alimentadas progressivamente por cerca de cinco dias, seguindo a operculação. Nos Meliponini o aprovisionamento é feito de forma massal, operárias nutridoras suprem a célula de cria com uma mistura de alimento larval, pólen e mel, e só depois rainha oviposita, ocorrendo, posteriormente, a operculação. As seqüências comportamentais envolvendo as fases de construção de células de cria, aprovisionamento, oviposição e operculação são chamadas coletivamente de “cell provisioning and oviposition process” (**POP**). Estes ciclos diários de reprodução envolvem freqüentemente complexas interações grupo-específicas entre rainha e operárias (SAKAGAMI et al., 1965; SAKAGAMI & ZUCCHI, 1974; ZUCCHI, 1977; SAKAGAMI, 1982).

Na maioria das espécies de Meliponini, operárias desenvolvem ovários e colocam ovos, que podem ser comidos pela rainha ou dar origem a machos (SAKAGAMI & ZUCCHI, 1963; BEIG, 1972; TERADA, 1974; SAKAGAMI, 1982; SOMMEIJER & VAN BUREN 1992; KOEDAM *et al.*, 1996, 2001). No entanto, exceções podem ocorrer em algumas espécies. SAKAGAMI et al. (1963) observaram que em *Leurotrigona muelleri*, a exemplo do que ocorre com *A. mellifera*, operárias só desenvolvem os ovários durante a ausência da rainha ou em colônias altamente povoadas. Alguns casos extremos são relatados para *Frieseomelitta varia*, *Frieseomelitta silvestri* e *Duckeola ghiliani*, no qual operárias nunca desenvolvem os ovários, na presença ou ausência da rainha (TERADA, 1974; ZUCCHI, 1977). Por este motivo são classificadas por ZUCCHI (1993) como hipersociais, uma vez que não há alterações no desenvolvimento dos ovários, a capacidade reprodutiva estaria limitada apenas à rainha da colônia.

Diferente dos Apini, interações trofaláticas em Meliponini são infrequentes e muitas vezes não observadas (SAKAGAMI, 1982; SOMMEIJER & BRUIJN, 1994). Sua ocorrência geralmente está associada com o aprovisionamento de células de cria (SOMMEIJER et al., 1982, 1985). Conforme ZUCCHI (1993), interações trofaláticas entre operárias e rainha de abelhas sem ferrão são simbólicas, considerando que a rainha

se alimenta de modo particular. Como reportado por vários autores (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; SOMMEIJER et al., 1985; ZUCCHI, 1977, 1993; ROUBIK, 1989; SOMMEIJER & BRUIJN, 1994), a rainha recebe alimento das operárias indiretamente, ingerindo alimento larval regurgitado por estas nas células de cria durante o **POP**, ou de ovos tróficos postos pelas operárias antes de sua oviposição.

Portanto, interações agonísticas entre operárias e rainha com a finalidade acima descrita, representam, conforme ZUCCHI (1977, 1993), um comportamento de dominância ritualizada, tendo como finalidade a manutenção de uma posição ou situação. Desta forma, as manifestações agressivas são simbólicas e, provavelmente, um relicto evolutivo de um comportamento agressivo real.

Como já discutido no segundo capítulo desta tese, a presença de rainhas virgens em colônias com rainha dominante desencadeia interações agonísticas entre rainhas virgens e operárias ou outras rainhas virgens, bem como, envolvem constante solicitação de alimento. Estas interações podem resultar na morte ou aceitação de uma rainha virgem como rainha dominante, substituindo a rainha anterior, ou então, a rainha virgen aceita pode partir com operárias de diversas idades e fundar uma nova colônia (IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995). KOEDAM et al. (1995) sugerem que, parte das rainhas virgens em colônias com rainha dominante, morrem devido à privação de alimento. Portanto, a inabilidade da rainha virgem de obter alimento armazenado nos potes, torna as trocas trofaláticas entre operárias nutridoras indispensáveis para a sua sobrevivência.

Operárias nutridoras de muitas espécies de Meliponini possuem ovários e glândulas hipofaringeanas bem desenvolvidas (SAKAGAMI et al., 1963) e interagem com rainhas mais frequentemente, ao contrário de operárias recém-emergidas e forrageiras (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; SOMMEIJER et al., 1985).

No segundo capítulo desta tese, verificamos que operárias nutridoras e recém-emergidas foram mais tolerantes com rainhas virgens do que forrageiras. Todavia, só operárias nutridoras formaram corte e retornaram as solicitações de alimento com mais frequência. Este comportamento indica que, operárias de determinadas fases etárias, respondem de forma particular às manifestações ritualizadas de dominância, tanto de rainhas virgens, quanto de rainhas fisogástricas. Estudos realizados por SOMMEIJER et al. (1984, 1985) e SOMMEIJER & BRUIJN (1994) sugerem que os sinais de dominância ritualizada possuem função comunicativa, e que a participação de operárias

na corte da rainha está relacionada com a participação das operárias envolvidas na construção de células de cria.

Embora alguns aspectos biológicos e comportamentais da reprodução em algumas espécies de Meliponini sejam conhecidos, tais como: multiplicação e sucessão de colônias (KERR et al., 1962; SILVA et al., 1972; MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; ROUBIK, 1989) Processo de Postura e Aprovisionamento (**POP**) (SAKAGAMI, 1982; DRUMOND et al., 2000), trabalhos envolvendo reprodução de Meliponini em condições de laboratório são escassos. CAMARGO (1972, 1974, 1976) desenvolveu técnica de cruzamento natural de *M. quadrifasciata* sob condições controladas para estudos genéticos. Este método, com poucas variações, foi utilizado por AIDAR.(1995) com a finalidade de avaliar métodos de multiplicação artificial de colônias de *M. quadrifasciata* em condições de laboratório. Em estudo sobre a influência do aparelho genital masculino na ativação ovariana de rainhas de *M. quadrifasciata*, MELO et al. (2001) também se utilizaram do método desenvolvido por CAMARGO (1976)

A especialização de tarefas por operárias em colônias de insetos sociais pode conduzir a uma divisão mais eficiente de trabalho e, portanto, maior fitness reprodutivo (OSTER & WILSON, 1978). O que torna importante saber qual momento da fase etária vivida pelas operárias para que os métodos de introdução de rainhas copuladas em condições de laboratório tenham sucesso.

Portanto, mais estudos acerca das características etológicas envolvidas no processo de reprodução, em particular, do polietismo etário, são necessários para o aperfeiçoamento de métodos de reprodução *ex situ* de abelhas sem ferrão. Isto possibilitará a formação de meliponários para fins de pesquisa e aumento da variabilidade genética através de permuta de rainhas fisogástricas obtidas através de cruzamentos controlados. Portanto, tornando viáveis projetos que envolvam a reintrodução de espécies do gênero *Melipona*, em particular de *M. quadrifasciata*, em áreas que a mesma esteja ameaçada.

Este trabalho tem como objetivo investigar a influência do status comportamental das operárias sobre o tempo de pré-oviposição e sobrevivência de rainhas de *M. quadrifasciata* em condições de laboratório.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida no Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV–MG e Laboratório de Biologia de Abelhas do Departamento de Biologia Geral, no período de novembro de 2002 a setembro de 2004.

Foram utilizadas como matrizes, colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* existentes no meliponário desta instituição.

4.2.1. Obtenção das abelhas

Operárias forrageiras foram obtidas com rede entomológica quando retornavam das atividades de coleta. Operárias nutridoras foram capturadas na área destinada aos discos de cria, identificadas de acordo com o padrão de coloração característico (FAGUNDES et al., 2006). Operárias recém–emergidas e rainhas virgens foram coletadas de discos de cria nascentes, obtidos das colônias matrizes e mantidos em estufa BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Embora, a produção de machos de *M. quadrifasciata* para a região de Viçosa–MG, ocorra nos meses de junho a agosto e em outubro (BEZERRA, 1994), ainda foi possível encontrá–los até os meados do mês de novembro. Os machos foram coletados próximos ao meliponário da Universidade Federal de Viçosa, quando estavam pousados nas paredes externas das colméias ou em agregações em troncos de árvores e paredes das instalações do meliponário. Machos foram obtidos, também, de colônias de *M. quadrifasciata* mantidas dentro do Laboratório de Abelhas. Estas colônias foram abertas para que, machos prestes a serem expulsos pelas operárias, pudessem ser capturados. Os machos encontrados na situação acima descrita já apresentam maturidade para a reprodução, com a maioria dos espermatozoides localizados na vesícula seminal (KERR & KRAUSE, 1950).

4.2.2. Formação das mini-colônias e introdução de rainhas recém copuladas.

Com a finalidade de facilitar o manejo as colônias formadas foram acondicionadas em colméias de observação (15 X 15 X 7 cm), com duas gavetas removíveis (5,5 X 4 X 1,5 cm), situadas em lados opostos da parte inferior da parede da colméia, uma de frete para a outra. Sendo destinadas respectivamente, ao depósito de lixo e ao fornecimento de mel. Estes compartimentos foram impermeabilizados com cera de *Apis mellifera* para facilitar a limpeza e evitar a infiltração de mel por entre as frestas da madeira. Este tratamento foi necessário, também, para evitar o contato das abelhas com substâncias tóxicas utilizadas no tratamento da madeira. Estas colméias foram cobertas com placas de vidro, forradas com celofane vermelho (BURNS et al., 2002). Este procedimento foi utilizado para facilitar o manejo e evitar perturbações durante o período de observação dos experimentos

Foram constituídas 56 mini-colônias durante o período de realização dos experimentos. Cada uma recebeu, pedaços de invólucro, obtidos das colônias matrizes, pote artificial contendo pólen, confeccionados com 30% de cera de *Melipona* e 70% de cera de *Apis mellifera*, uma provisão de mel depositado na gaveta destinada a este propósito. Na gaveta destinada ao lixo foi colocado um retângulo de papel filtro, embebido com uma solução de 30% de excretas e 70% de água destilada. Esta solução foi utilizada com a finalidade de estimular as operárias a depositarem o lixo e defecarem naquele compartimento. Foram feitas 14 repetições para cada um dos quatro tratamentos. Cada colônia de observação recebeu uma população de 60 operárias, constituídas da seguinte forma:

Tratamento 1 (Rem) – Rainhas recém-copuladas introduzidas junto com 10 operárias recém-emergidas, sendo acrescentado de 10 a 20 operárias por dia até obter a população de 60 operárias;

Tratamento 2 (Nut) – Rainhas recém copuladas introduzidas junto com 10 operárias nutridoras, sendo acrescentado de 10 a 20 operárias por dia até obter a população desejada. Devido a tolerância dessa classe comportamental foi possível misturar operárias nutridoras de diferentes colônias sem o risco de rejeição, como verificado no 1º capítulo desta tese;

Tratamento 3 (Forr) –Estas colônias foram formadas sempre com indivíduos de mesma origem. Nestas colméias, os 60 indivíduos foram introduzidos de uma só vez. Neste tratamento, rainhas recém-emergidas (0 dia de idade) foram introduzidas virgens, sendo copuladas três dias depois, e só então, reintroduzidas. Este procedimento foi adotado para se ter certeza que as rainhas não seriam rejeitadas e mortas após completar três dias de idade.

Tratamento 4 (Mist)– Rainhas recém–copuladas introduzidas em colônias com 20 operárias recém–emergidas, 20 operárias forrageiras e 20 operárias nutridoras. Como verificado no primeiro capítulo desta tese, encontros entre operárias guarda e nutridoras de origens diferentes resultam em agressão por parte de ambos os grupos. Por este motivo, indivíduos desta classe comportamental tiveram sempre a mesma origem. Neste tratamento, rainhas recém-emergidas (0 dia de idade) foram introduzidas virgens, sendo copuladas três dias depois e reintroduzidas logo após a cópula. Procedimento adotado pelos mesmos motivos alegados no tratamento anterior.

4.2.3 - Cópula em condições de laboratório

As rainhas utilizadas nos cruzamentos tinham de três a cinco dias idade, enquanto os machos possuíam idades desconhecidas, já que foram coletados nas paredes das colméias, em agregações nas paredes externas do apiário e pousados sobre árvores. As rainhas e os machos foram mantidos separados até o momento da cópula (CAMARGO, 1976). No momento propício, macho e fêmea foram colocados numa placa de Petri, onde foram observados todas as etapas do comportamento de cópula (**Figura 9**). Nos tratamentos envolvendo população constituída só por operárias guarda ou população mista, rainhas virgens de 0 dia de idade foram introduzidas, ainda virgens, sendo copuladas três dias depois. Este procedimento foi necessário, devido a elevada mortalidade de rainhas virgens de idade mais avançada (um, dois e três dias de idade), em encontros com operárias forrageiras (ver segundo capítulo desta tese). Após copuladas, as rainhas receberam uma marca de tinta, atóxica, sobre o tórax. O cruzamento foi considerado válido, quando, ao examinar-se a parte terminal do abdômen do macho, notou-se a ausência de sua cápsula genital. Tomou-se o cuidado de evitar, sempre que possível, o contato direto da mão com a rainha, a fim de minimizar os riscos de rejeição das rainhas virgens durante a introdução.

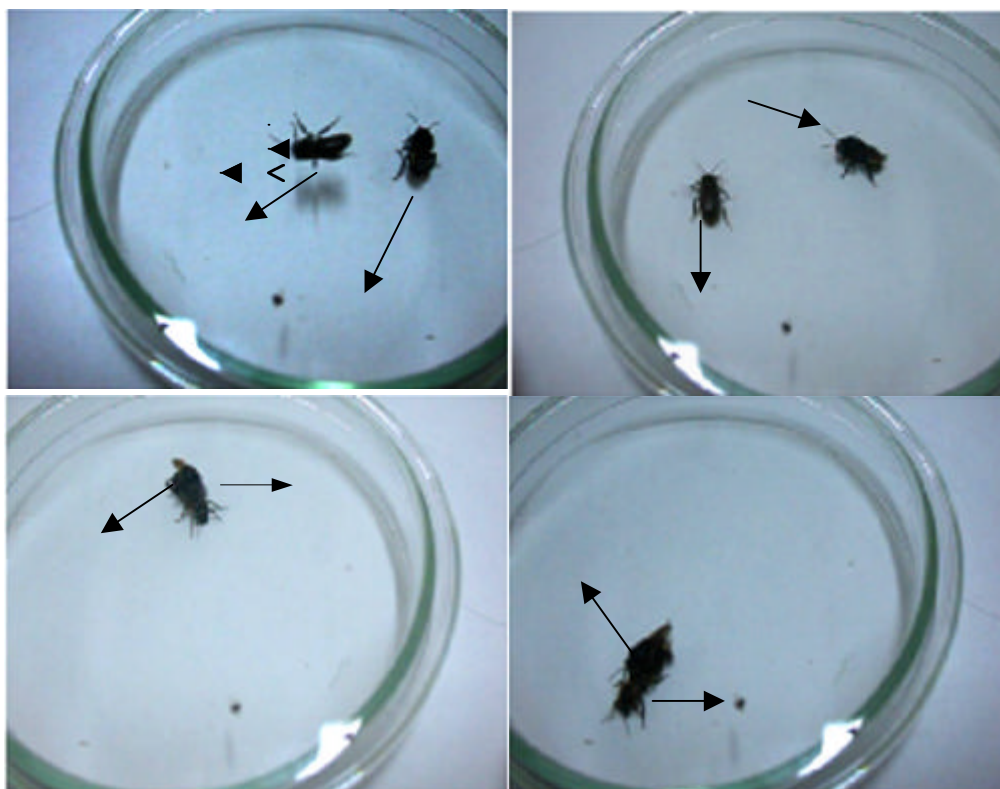


Fig. 9 – Seqüência de cópula natural em condições de laboratório.

4.2.4 - Manejo e coleta de dados

As colméias de observação foram mantidas em estufa BOD a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo etiquetadas com o dia do cruzamento, idade das rainhas virgens cruzada e tratamento. Operárias mortas no decorrer do experimento foram, na medida do possível, substituídas pelo mesmo tipo comportamental, na tentativa de manter a população constante. As abelhas foram alimentadas *ad libitum*, com xarope e pólen fermentado (CAMARGO, 1976; AIDAR & CAMPOS, 1994; AIDAR, 1995). O lixo depositado pelas abelhas foi coletado semanalmente, sendo o papel filtro umedecido com a solução de excretas, renovado a cada limpeza. O tempo decorrido entre o cruzamento e o início da postura, bem como, o tempo de sobrevivência, do momento da introdução até o tempo limite de observação, foram anotados. Interações operária–rainha, durante a introdução das rainhas recém–copuladas, foram filmadas e fotografadas com câmara digital (Sony). Atividades de construção de elementos do ninho, bem como, quando possível, o registro do primeiro **POP**.

Foi utilizada estatística **Kaplan–Meier** (KAPLAN & MEIER, 1958) para dados censurados, com o intuito de estimar o efeito das fases etárias das operárias sobre o período de pré-oviposição e sobrevivência de rainhas de *M. quadrifasciata* em condições de laboratório. O tempo limite de observação estabelecido para este estudo foi de 35 dias. Foi aplicado o teste de **log–rank** para fazer comparação entre as curvas de cada tratamento. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises foram feitas utilizando-se o *programa Statistica 6.0* (Statsoft Inc. 2001)

4.3. RESULTADOS

No tratamento envolvendo colônias com população constituída por forrageiras, nenhuma rainha entrou em postura até o tempo limite de observação (**Tabela 7**). No entanto, 100% das rainhas que foram introduzidas em colônias com população de operárias nutridoradoras entraram em postura até o final do período de observação do experimento (**Tabela 8**). O tempo médio (\pm DP) para início de postura foi de **12,1 (\pm 1,6)** dias (**Figura 10**). Embora a média para o período de pré-oviposição em colônias com população mista (operárias nutridoradoras, forrageiras e recém-emergidas) seja de **13,7 (\pm 2,2)** dias (**Figura 10**), a porcentagem de rainhas que entraram em postura para este tratamento foi de **78,5%**, menor do que o encontrado para o tratamento anterior (**Tabela 9**). A porcentagem de rainhas que entraram em postura em colônias com população de operárias recém emergidas foi de **28,5%** (**Tabela 10**), sendo a média de **32,5 (\pm 2,5)** dias para o período de pré-oviposição (**Figura 10**).

A análise estatística (KAPLAN & MEIER, 1958) mostrou diferenças estatisticamente significativas ($X^2= 21,33382$ gl= 2; $p = 0,00002$) quanto ao período de pré-oviposição. O teste **log-rank** indicou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de **Rem X Nut** (Log-Rank= **4,386711**; $p= ,00001$), **Nut X Mist** (Log-Rank= **2,445212**; $p= 0,01448$) e **Rem X Mist** (Log-Rank= **3,31006**; $p= 0,00093$).

No tratamento onde rainhas recém-copuladas foram introduzidas em colônias com operárias forrageiras não houve rainhas sobreviventes (**Tabela 7**), que morreram em média, com **11,6 \pm 1** dias depois de copuladas (**Figura 11**). A porcentagem de rainhas vivas até o período final de observação do experimento (**35 dias**), em colônias constituídas por operárias nutridoradoras, foi de **92,8%** (**Tabela 8**). Neste tratamento só ocorreu uma morte no trigésimo segundo dia de observação (**Tabela 8**). Nos tratamento aonde as rainhas foram introduzidas com população mista (operárias nutridoradoras, forrageiras e recém-emergidas), a porcentagem de rainhas vivas até o período limite de observação foi de **78,7%** (**Tabela 9**). O tempo médio de óbito estimado para este tratamento foi de **30,7 (\pm 8,7)** dias (**Figura 11**). A sobrevivência de rainhas em colônias constituídas por operárias recém-emergidas foi baixa (**28,5%**) (**Tabela 10**).

Neste tratamento as rainhas morreram em média aos **19,7 (\pm 10,8)** dias após a cópula (**Figura 11**).

Quanto à sobrevivência das rainhas até o período limite de observação de 35 dias, a estimativa Kaplan–Meier (**Figura 11**) mostrou diferenças estatisticamente significativas ($X^2= 34.61063$ gl= 3; $p = 0,00000$) quanto ao efeito do status comportamental das operárias sobre a sobrevivência das rainhas. O teste **log–rank** indicou diferenças nas curvas de sobrevivência entre os tratamentos **Rem X Nut** (Log-Rank Test= **-3.85566**; $p= 0,00012$), **Nut X Forr** (Log-Rank Test= **-4,88892**; $p= 0,00000$), **Rem X Forr** (Log-Rank Test= **-2,58732**; $p =.00967$) e **Rem X Mist** (Log-Rank Test= **2,978639**; $p= 0,00290$). No entanto não ocorreu diferenças significativas entre **Nut X Mist** (Log-Rank Test= **-1,11819**; $p= 0,26349$).

4.3.1. Descrição das interações operária–rainha e das atividades de construção de elementos do ninho.

No tratamento onde as colônias foram constituídas com operárias forrageiras a ocorrência de cortes foi irrisória (**14,2%**; **Tabela 7**). Durante estas cortes não ocorreram interações trofaláticas entre rainha e operárias (**Tabela 7**). Neste tratamento não foi registrada nenhuma construção de célula de cria.

Como verificado no segundo capítulo desta tese, rainhas virgens, independentemente de sua idade, desencadearam nas operárias nutridoras o comportamento de corte. No experimento do presente capítulo este comportamento foi confirmado, indicando que o processo de aceitação ocorre, também, com rainhas inseminadas. O comportamento de corte foi verificado em **100%** dos casos observados para este tratamento (**Tabela 8**). Ao serem circundadas pelas operárias, as rainhas exibiram o abdômen inflado, movimentos circulares, giros sobre o próprio eixo, por vezes em sentido horário e noutras em sentido anti–horário, com paradas e guinadas abruptas em direção às operárias. Constantes solicitações por alimento foram feitas através de contatos antenais, auxiliados pelas pernas anteriores. As operárias participantes desta corte, por sua vez, faziam movimentos de ataque e recuo. Em **100%** (**Tabela 8**) dos casos observados ocorreram interações trofaláticas entre rainha e operária nutridora durante as cortes formadas (**Figura 12**).

Operárias nutridoras iniciaram a construção da primeira célula de cria sobre uma pequena base de cera (**Figura 13**). As atividades de construção de elementos do ninho (pilares, invólucro, potes de alimento) foram iniciadas, em média, aos dois dias após a introdução da rainha. Estas operárias foram capazes de coletar o mel do alimentador e depositá-lo nos potes de alimento construídos por elas. Visitas de inspeção às células em construção foram, comumente, realizadas pela rainha fisogástrica (**Figura 14**). Nestas ocasiões as operárias se retiravam rapidamente da célula inspecionada pela rainha, só retornando às atividades de construção após a rainha ter se retirado. Após a célula estar pronta e apresentar colar, muitas operárias apareciam, e alternadamente, inseriam o metasoma na célula de cria (**Figura 15**). Devido a inexistência de contração abdominal durante algumas inserções, possivelmente, não houve regurgitação de alimento larval. Interações entre rainha e operária nesta fase se tornam mais agressivas, com a rainha agarrando a operárias com as pernas anteriores, fazendo antenações e solicitação de alimento. Em alguns momentos, a rainha tocou, freneticamente, com as antenas e pernas anteriores o abdômen da operária que estava inserida na célula de cria, como se a estimulasse a fazer descargas de alimento larval. Todas as rainhas fisogástricas observadas inseriram a glossa em células aprovisionadas, indicando que, podem obter alimento durante o processo de aprovisionamento. Antes de fazer a postura, as rainhas se mantiveram a uma pequena distancia da célula aprovisionada, e com as pernas fixas, faziam movimentos para frente e para traz. Em seis ocasiões, operárias colocaram ovos, que foram comidos pela rainha antes desta ovipositar. Após a oviposição, uma operária operculou a célula com movimentos rotativos.

Colônias constituídas por população mista (nutridoras, forrageiras e recém-emergidas), desenvolveram padrão comportamental semelhante, todavia, apenas operárias nutridoras participaram das cortes formadas em torno das rainhas recém copuladas. Em **85,7%** (**Tabela 9**) das cortes formadas em colônia mista, ocorreram interações trofaláticas entre rainhas e operárias nutridoras em **78,6%** (**Tabela 9**) dos casos. Com a progressão da idade, parte das operárias introduzidas como recém-emergidas passaram a atuar como nutridoras, se juntando àquelas originariamente introduzidas nesta fase. Todavia, operárias que foram introduzidas como forrageiras, não reverteram este comportamento, e desta forma, não participaram de atividades intranidais. As atividades de construção de elementos do ninho em colônias mistas, portanto, foram assumidas por operárias nutridoras e, mais tardiamente, por operárias

introduzidas como recém-emergidas. A construção de elementos do ninho para este tratamento ocorreu, em média, três dias depois da introdução da rainha.

No tratamento onde as colônias foram constituídas por operárias recém-emergidas, a ocorrência de corte se deu em **35,7%** dos casos, sendo que, as interações trofaláticas entre rainhas e operárias recém-emergidas, ocorreram em somente **28,6%** dos casos (**Tabela 10**). Operárias recém-emergidas começaram a construção da primeira célula de cria, trinta dias depois da introdução da rainha.

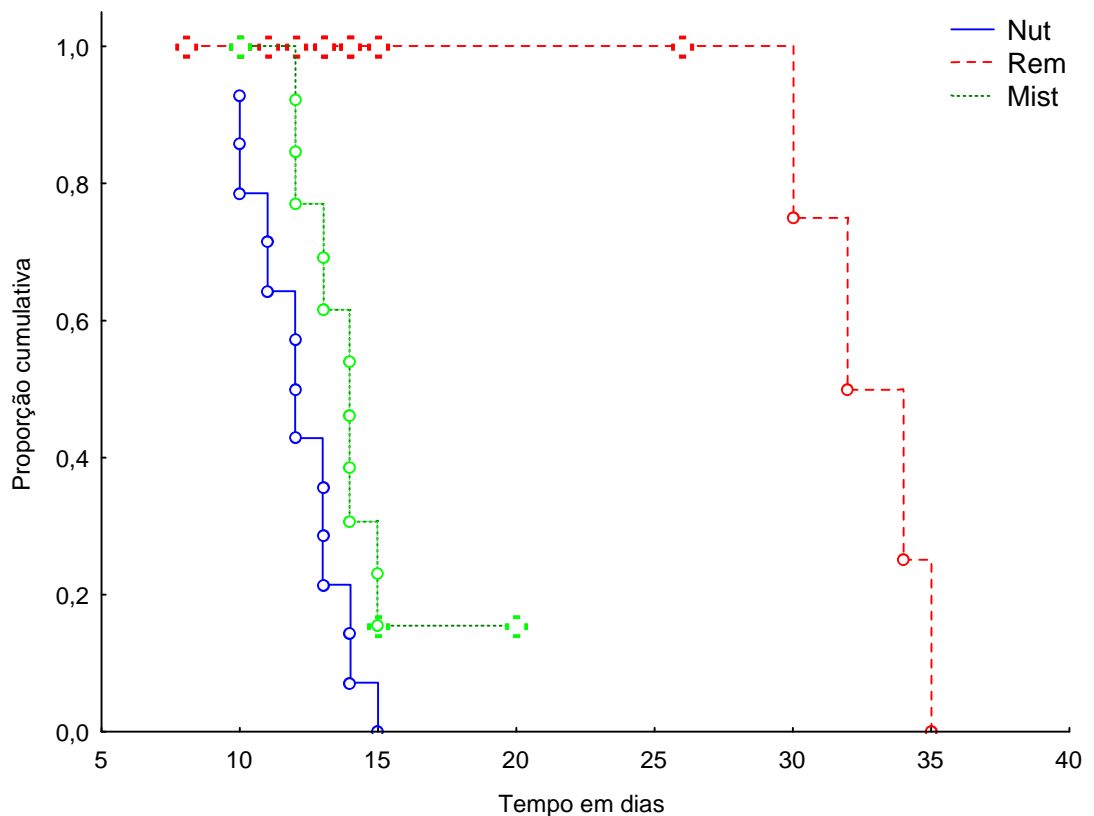


Fig. 10- Efeito da fase etária de operárias de *M. quadrifasciata* sobre o período de pré-oviposição de rainhas recém copuladas. O símbolo o representa ocorrência de postura enquanto que o símbolo + ausência de postura (Curvas de sobrevivência de Kaplan & Meier ; $p < 0.05$).

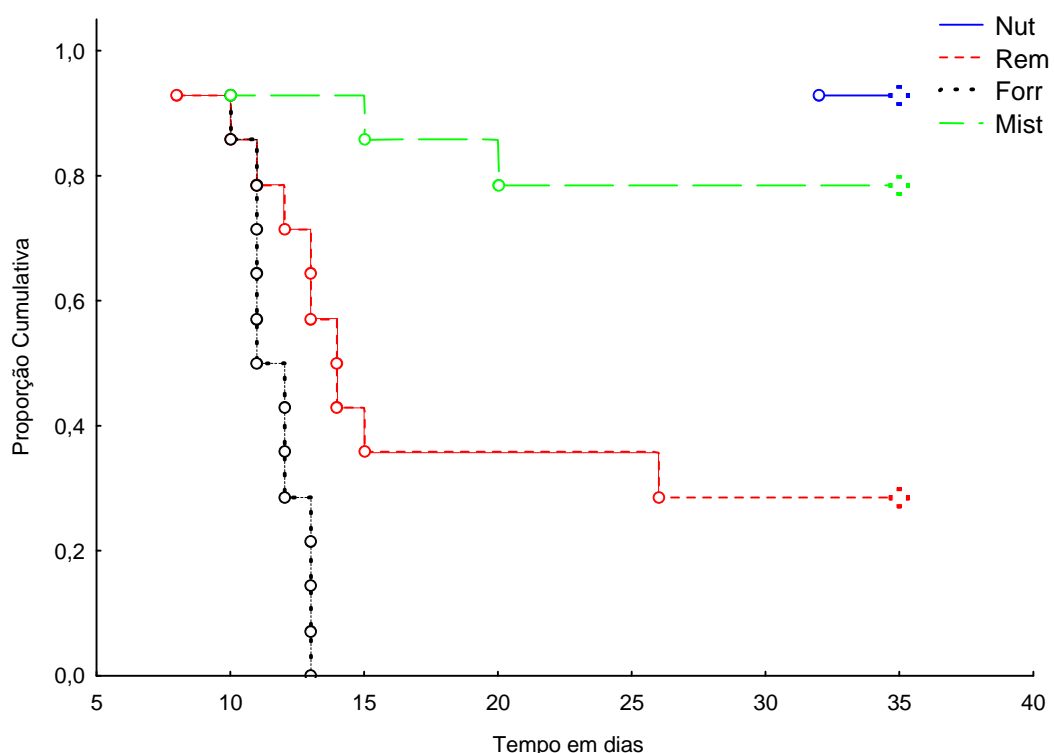


Fig. 11- Efeito da fase etária de operárias de *M. quadrifasciata* sobre a sobrevivência de rainhas recém copuladas. O símbolo **o** representa ocorrência de morte da rainha enquanto que o símbolo **+** representa a sobrevivência até o período limite de observação (35 dias) (Curvas de sobrevivência de Kaplan & Méier; $p < 0,05$).

Tabela 7- Porcentagem de postura, ocorrência de corte, ocorrência de interações trofaláticas e sobrevivência de rainhas de *M. quadrifasciata* em colônias constituídas por operárias forrageiras.

Nº	Idade	Data da cópula	Data da postura	Postura	Corte	Trofaláxia	Óbito	Sobrevivência*	
01	1	14/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	27/10/03	13	
02	1	10/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	23/10/03	13	
03	1	11/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	22/10/03	11	
04	1	11/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	23/10/03	12	
05	1	14/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	25/10/03	11	
06	1	15/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	27/10/03	14	
07	1	21/09/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	03/10/03	12	
08	1	21/09/03	-	NÃO	SIM	NÃO	02/10/03	11	
09	1	20/08/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	01/09/03	14	
10	1	22/08/03	-	NÃO	SIM	NÃO	04/09/03	13	
11	1	01/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	12/10/03	11	
12	1	01/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	14/10/03	13	
13	1	01/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	12/10/03	11	
14	1	09/10/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	21/10/03	12	
				%	0%	14,2%	0%	100%	0%

* Sobrevivência de rainhas até o 35º dia de

Tabela 8- Porcentagem de postura, ocorrência de corte, ocorrência de interações trofaláticas e sobrevivência de rainhas de *M. quadrifasciata* em colônias constituídas por operárias nutridoras.

Nº	Idade	Data da cópula	Data da postura	Postura	Corte	Trofaláxia	Óbito	Sobrevivência*	
01	05	09/09/02	19/09/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
02	04	11/09/02	23/09/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
03	03	16/09/02	29/09/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
04	04	17/09/02	01/10/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
05	05	17/09/02	30/09/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
06	04	18/09/02	30/09/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
07	05	20/09/02	30/09/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
08	03	21/09/02	02/10/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
09	05	16/10/02	30/10/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
10	05	21/10/02	31/10/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
11	04	21/10/02	03/11/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
12	05	21/10/02	01/11/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
13	04	22/10/02	02/11/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
14	03	22/10/02	06/11/02	SIM	SIM	SIM	24/11/02	32	
				%	100%	100%	100%	7,2%	92,8%

Tabela 9- Porcentagem de postura, ocorrência de corte, ocorrência de interações trofaláticas e sobrevivência de rainhas de *M. quadrifasciata* em colônias constituídas por população mista.

Nº	Idade	Data da cópula	Data da postura	Postura	Corte	Trofaláxia	Óbito	Sobrevivência*	
01	1	24/10/03	08/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
02	1	08/10/03	20/10/03	SIM	SIM	SIM		35	
03	1	27/10/03	08/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
04	1	27/10/03	09/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
05	1	24/10/03	07/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
06	1	10/11/03	-	NÃO	NÃO	NÃO	30/11/03	20	
07	1	17/11/03	-	NÃO	SIM	NÃO	27/11/03	10	
08	1	31/10/03	13/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
09	1	05/11/03	19/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
10	1	30/10/03	11/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
11	1	21/10/03	04/11/03	SIM	SIM	NÃO		35	
12	1	04/11/03	19/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
13	1	04/11/03	18/11/03	SIM	SIM	SIM		35	
14	1	04/11/03	-	NÃO	NÃO	SIM	19/11/03	15	
				%	78,5%	85,7%	78,6%	21,5%	78,5%

*Sobrevivência de rainhas até o 35º dia de observação

Tabela 10- Porcentagem de postura, ocorrência de corte, ocorrência de interações trofaláticas e sobrevivência de rainhas de *M. quadrifasciata* em colônias constituídas por operárias recém-emergidas.

Nº	Idade	Data da cópula	Data da postura	postura	Corte	Trofalácia	Óbito	Sobrevivência*	
01	05	27/10/02	26/11/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
02	03	28/10/02	-	NÃO	NÃO	NÃO	10/11/02	13	
03	05	28/10/02	-	NÃO	SIM	NÃO	23/11/02	26	
04	05	08/10/02	12/11/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
05	05	30/10/02	-	NÃO	NÃO	NÃO	14/11/02	14	
06	03	08/11/02	-	NÃO	NÃO	NÃO	18/11/02	10	
07	04	08/11/02	-	NÃO	NÃO	NÃO	21/11/02	13	
08	04	11/11/02	12/12/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
09	03	11/11/02	-	NÃO	NÃO	NÃO	22/11/02	11	
10	05	11/11/02		NÃO	NÃO	NÃO	25/11/02	14	
11	04	01/10/02	05/11/02	SIM	SIM	SIM	-	35	
12	05	01/12/02	-	NÃO	NÃO	NÃO	13/12/02	12	
13	04	01/12/02	-	NÃO	NÃO	NÃO	16/12/02	15	
14	04	09/12/02	-	NÃO	NÃO	NÃO	17/12/02	8	
				%	28,6%	35,7%	28,6%,	71,4%	28,6%

* Sobrevivência de rainhas até o 35º dia de observação



Fig. 12– Trofaláxia entre rainha recém-copulada e operária e operária nutridora.



Fig. 13– Célula de cria em várias fases de construção.



Fig. 14– Inspeção de célula de cria por rainha fisogástrica.



Fig. 15– Operária nutridora com o metassoma inserido na célula de cria.

4.4. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que, nos tratamentos em que operárias nutridoras estiveram presentes, estas foram capazes de realizar todas as tarefas relacionadas com a construção de estruturas do ninho (pilares, invólucro, potes de alimento e células de cria), dois dias após a introdução da rainha. Isto corrobora com trabalhos que indicam que atividades de construção e aprovisionamento de células de cria em *M. quadrifasciata* (KERR & SANTOS–NETO, 1956), *Apotrigona nebulata* (DARCHAN, 1969), *M. rufiventris* (CECCATO, 1970) *Scaptotrigona postica* (SIMÕES, 1973) e *M. Favosa* (SOMMEIJER et al., 1982; SOMMEIJER, 1984) são realizadas por operárias nutridoras de uma mesma classe de idade. Estas abelhas possuem ovários, glândulas hipofaríngeas e glândulas de cera desenvolvidas (KERR & SANTOS–NETO, 1956; SAKAGAMI et al., 1963; BEGO, 1974), indicando que, atividades de aprovisionamento e construção de elementos do ninho, são realizadas paralelamente.

Conforme DRUMOND et al. (1999), embora a rainha fisogástrica seja necessária para manter a periodicidade de produção de crias, todos os elementos da construção de células e aprovisionamento permanecem em colônias encabeçadas por uma rainha virgem. Como descrito no segundo capítulo desta tese, operárias nutridoras formaram corte e realizaram interações trofaláticas com rainhas virgens, padrão comportamental semelhante ao encontrado para rainhas recém-copuladas. Este comportamento demonstra que, embora ainda não estivessem fisogástricas, as rainhas inseminadas conseguiram estabelecer uma relação de dominância parcial. Este comportamento deve ter facilitado o acesso a nutrientes durante a introdução das rainhas recém-copuladas, garantindo a sua sobrevivência durante os primeiros dias de vida.

Interações trofaláticas entre indivíduos de colônias de Meliponini são infrequentes (SOMMEIJER et al., 1985; SAKAGAMI, 1982), todavia, quando as solicitações de alimento são feitas durante o **POP** ou corte (ver segundo capítulo desta tese), as chances de retorno destas solicitações são maiores (SOMMEIJER et al., 1985). Contudo, grande parte do alimento adquirido pela rainha ocorre de forma indireta, pela ingestão de alimento larval regurgitado nas células de cria por operárias nutridoras ou

de ovos tróficos produzidos por estas operárias durante o processo de postura e provisionamento (**POP**) (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982; SOMMEIJER & BRUIJN, 1994; ROUBIK, 1989). WEBSTER & PENG (1988) sugerem que ovos tróficos são mais facilmente assimilados do que o pólen, e a semelhança do que ocorre com alimento larval em *Apis mellifera*, pode servir para aumentar a fecundidade da rainha, opinião compartilhada por VELTHUIS et al. (2001).

A secreção das glândulas hipofaríngeas em Meliponini, mais do que um componente alimentar, pode ter função enzimática, facilitando a digestão do pólen, principal fonte de proteína das rainhas (VELTHUIS, 1993). Portanto, recursos alimentares disponibilizados pelas operárias nutridoras durante as trofalaxias ou em células de cria, bem como, manifestações de dominância ritualizada durante as cortes, podem ter sido responsáveis pelo desenvolvimento ovariano e pela precocidade das rainhas quanto ao período de pré-ovoposição. Conforme WHEELER (1996), a ovogênese em insetos é um processo tipicamente limitado por nutrientes. Esta autora salienta que o fluxo de alimento dentro da colônia é o principal fator de regulação da fecundidade.

A inexistência de interações trofaláticas entre operárias forrageiras e rainhas, bem como, atividades de construção de estruturas do ninho (pilares, invólucro, e célula de cria), indicam que estas operárias foram incapazes de reativar as glândulas hipofaríngeas e de cera, visto que estas estruturas estão degeneradas nestas operárias (CRUZ-LANDIM & HADEK, 1969; CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002; FAGUNDES et al., 2006). Portanto, a mortalidade precoce de rainhas, em colônias constituídas com população de operárias forrageiras, foi causada, principalmente, pela privação de alimento.

Interações entre operária-operária são responsáveis pela plasticidade da divisão de trabalho com relação a necessidades específicas da colônia em *Apis mellifera* (HUANG et al., 1998; HUANG & ROBINSON, 1992, 1996) e em formigas cortadeiras (GORDON, 1989, 1996). Operárias que foram introduzidas como recém-emergidas só iniciaram trabalhos com cera trinta dias depois de iniciado o experimento. A ausência de interações com operárias de outras fases etárias, notadamente de operárias nutridoras, pode ter contribuído para o retardo na ativação desta glândula e pelo desenvolvimento comportamental tardio, influenciados respectivamente, pela privação de nutrientes (secreção glandular) e pela ausência de contato com operárias mais experientes.

Como relatado no segundo capítulo desta tese, operárias recém-emergidas raramente formam corte. Este fato pode estar relacionado com a insipiente atividade das glândulas hipofaríngeas nesta fase etária e, como já mencionado aqui, solicitações de alimento durante a corte e processo de provisionamento têm maiores chances de serem atendidas que em outras ocasiões. Desta forma, a privação de alimento durante os primeiros dias de vida das rainhas deve ter causado a maioria das mortes, bem como, prejudicado a ativação ovariana das rainhas e, conseqüentemente, adiado sua postura.

Em trabalho realizado com *M. quadrifasciata*, CAMARGO (1976) fez 29 cruzamentos controlados com rainhas, utilizando população de abelhas recém-emergidas para a formação de colônias. Destes cruzamentos, apenas 12 rainhas realizaram postura, ou seja, 41,3%. O menor tempo para o início da postura foi de dezoito dias e o maior de quarenta e nove dias. Não foram mencionados resultados quanto a sobrevivência das rainhas. Embora a porcentagem de rainhas que entraram em postura neste trabalho (**41,3%**) seja maior do que a por nós encontrada (**28,5%**), utilizando operárias recém-emergidas, tudo indica que a autora não estabeleceu um tempo limite para o experimento em questão. Considerando este fato, inferimos que, se o tempo limite de 35 dias, estabelecido para o presente experimento, fosse adotado pela a autora acima referida, e censurássemos todas as rainhas que entraram em postura depois deste limite, teríamos **27, 6% (N=29)** de rainhas em postura. Portanto, muito próximo à porcentagem por nós encontrada.

Em condições naturais, rainhas de algumas espécies de *Melipona* realizaram postura entre cinco e quarenta dias após a cópula (KERR et al., 1962; SILVA et al., 1972). A grande variação no tempo de postura encontrado por estes autores, possivelmente se deve às flutuações ambientais e as condições inerentes a cada colônia, como por exemplo, estoque de recursos e perfil demográfico. Estes fatores podem facilitar ou dificultar o acesso da rainha aos recursos, refletindo, portanto, no seu potencial reprodutivo.

Embora a escassez de dados não nos permita maiores comparações, os resultados apresentados neste capítulo de tese, confirmam a hipótese levantada para o presente estudo. Portanto, a idade das operárias influencia no tempo de pré-oviposição, bem como, a sobrevivência de rainhas de *M. quadrifasciata* em condições de laboratório. Além disso, indica que operárias nutridoras, entre as quais, as envolvidas com o **POP**, são as mais adequadas para a formação de colônias em condições de laboratório.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AIDAR, D. S. 1995. Multiplicação Artificial e Manejo de Colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera Apidae, Meliponinae). Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa-UFV (Dissertação de Ms.).
- AIDAR, D. S. & CAMPOS, L. A. O. 1994. Resposta de meliponínios à alimentação artificial (*Melipona quadrifasciata* Lep, Meliponinae, Apidae). In: *Ann. Enc. Etologia*, pp. 105-106.
- BEGO, L. R. 1974. Estudos sobre a regulação social em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille com especial referência a aspectos morfo-funcionais (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP (Dissertação de Ms.).
- BEIG, D. 1972. Social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica*. *J. Apicult. Res*, **11**, 33-39.
- BEN-SHAHAR, Y., ROBICHON, A., SOKOLOWSKI, M. B. & ROBINSON, G. E. 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science*, **296**, 741-744.
- BEZERRA, J. M. 1994. Aspectos da reprodução de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa-UFV (Dissertação de Ms.).
- BURNS, S. N., TEAL, P. E. A., VANDER MEER, R. K., NATION, J. L. & VOGT, J. T. 2002. Identification and action of juvenile hormone III from sexually mature alate females of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *J. Insec. Physiol.*, **48**, 357-365.
- CAMARGO, C. A. 1972. Mating of the social bee *Melipona quadrifasciata* under controlled conditions (Hymenoptera, Apidae). *J. Kans. Entomol. Soc.*, **45**, 520-523.
- CAMARGO, C. A. 1974. Cruzamento natural em confinamento de duas espécies de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae). *Cienc. Cultura*, **26**, 346.
- CAMARGO, C. A. 1976. Determinação do sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP (Tese D.S.)
- CECCATO, S. 1970. Divisão de trabalho entre as operárias de *Melipona rufiventris flavolineata* Friese (Hymenoptera. Apidae) São Paulo-SP: Instituto de Biociências-USP (Dissertação de Ms.).

- CRUZ-LANDIM, C. & ABDALLA, F. C. 2002. *Glândulas Exócrinas das Abelhas*. Ribeirão Preto-SP: FUMPEC-RP.
- CRUZ-LANDIM, C. & HADEK, R. 1969. Ultrastructure of *Apis mellifera* hypopharyngeal gland. In: *Proc. VI Congr. IUSSI*, pp. 121-130. Bern
- DARCHAN, R. 1969 Sur la biologie de *Trigona (Apotrigona) nebulata komiensis* Cock. *I. Biol. Gabonica.*, **5**, 151-187.
- DRUMOND, P. M., OLDROYD, B. P., DOLLIN, A. E. & DOLLIN, L. J. 1999. Oviposition behaviour of two Australian stingless bees, *Austroplebeia symei* Rayment and *Austroplebeia australis* Friese (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Austr. J. Entomol.*, **38**, 234-241.
- DRUMOND, P. M., OLDROYD, B. P. & OSBORNE, K. 2000. Worker reproduction in *Austroplebeia australis* Friese (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Insectes Soc.*, **47**, 333-336.
- FAGUNDES, I. B., SERRÃO, J. E. & CAMPOS, L. A. O. 2006. Tergite pigmentation indicate hypopharyngeal gland developmental degree in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, **48**, 1-12
- GORDON, D. M. 1989. Dynamics of task switching in harvester ants. *Anim. Behaviour*, **38**, 194-204.
- GORDON, D. M. 1996. The organization of work in social insect colonies. *Nature*, **380**, 121-124.
- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. 1990. *The Ants*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press
- HUANG, Z. Y., PLETTNER, E. & ROBINSON, G. E. 1998. Effects of social environment and worker mandibular glands on endocrine-mediated behavioral development in honey bees. *J. Comp. Physiol*, **183**, 143-152.
- HUANG, Z. Y. & ROBINSON, G. E. 1992. Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **89**, 11726 -11729.
- HUANG, Z. Y. & ROBINSON, G. E. 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav. Ecol. Sociobiol*, **39**, 147-158.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & ZUCCHI, R. 1995. Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. *Apidologie*, **26**, 231-244.
- KAPLAN, E. L. & MEIER, P. 1958. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Amer. Statist. Association*, **53**, 457-481.

- KERR, W. E. & KRAUSE, W. 1950 Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. I. Fecundação da rainha de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier. *Dusenía*, **1**, 275-282.
- KERR, W. E. & SANTOS–NETO, C. R. 1956. Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini.V. Divisão de trabalho entre operárias de *M. quadrifasciata*. *Insectes Soc.*, **3**, 423-430.
- KERR, W. E., ZUCCHI, R., NAKADAIRA, J. T. & BUTOLO, J. E. 1962. Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). *J.N.Y. Entomol. Soc.*, **70**, 265-276.
- KOEDAM, D., MONGE, A. I. & SOMMEIJER, M. J. 1995. Social interactions of rainhas virgens and their longevity in queenright colonies of *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae). *Neth. J. Zool.*, **45**, 480-494.
- KOEDAM, D., VELTHAUSZ, P. H., KRIFT, T. V. D., DOHMEN, M. R. & SOMMEIJER, M. J. 1996. Morphology of reproductive and trophic eggs and their controlled release by workers in *Trigona (Tetragonisca) angustula* Illiger (Apidae, Meliponinae). *Phys. Entomol.*, **21**, 289-296.
- KOEDAM, D., VELTHUIS, M. R., DOHMEN, M. R. & IMPERATRIZ–FONSECA, V. L. 2001. The behaviour of laying workers and the morphology and viability of their eggs in *Melipona bicolor bicolor*. *Phys. Entomol.*, **26**, 254-259.
- KOLMES, S. A. & SOMMEIJER, M. J. 1992a. Ergonomics in stingless bees: an experimental study of division of labor in *Melipona favosa*. *Insectes Soc.*, **39**, 215-232.
- KOLMES, S. A. & SOMMEIJER, M. J. 1992b. A quantitative analysis of behavioral specialization among worker stingless bees (*Melipona favosa* F.) performing hive duties. *J. Kansas Entom. Soc.*, **58**, 421-430.
- MELO, G. A. R., BUSCHINI, M. L. & CAMPOS, L. A. O. 2001. Ovarian activation in *Melipona quadrifasciata* queens triggered by mating plug stimulation (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, **32**, 355-361.
- MICHENER, C. D. 1974. *The Social Behavior of the Bees*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- MORITZ, R. F. & SOUTHWICK, E. E. 1993. *Bees as superorganisms: an evolutionary reality*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- OSTER, G. F. & WILSON, E. O. 1978. *Caste and Ecology in the Social Insects*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- PAGE, R., E., ROBINSON, G. E., BRITTON, D. S. & FONDRK, M. K. 1992:. Genotypic variability for rates of behavioral development in worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Ecol.*, **3**, 173-180.

- PAGE, R. E. & ROBINSON, G. E. 1991. The genetics of division of labor in honey bee colonies. *Adv. Ins. Physiol*, **23**, 117-169.
- RANGER, S. & O'DONNELL, S. 1999. Genotypic effects on forager behavior in the Neotropical stingless bee *Partamona bilineata* (Hymenoptera: Melionidae). *Naturwissenschaften*, **86**, 1-6.
- ROBINSON, G. E. 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.*, **37**, 636-665.
- ROBINSON, G. E., PAGE, R. E., STRAMBI, C. & STRAMBI, A. 1992. Mechanisms of behavioral reversion in honey bee colonies. *Ethology*, **90**, 336-345.
- ROUBIK, D. W. 1989. Ecology and Natural History of Tropical Bees. New York.: Cambridge University Press.
- SAKAGAMI, S. F. 1982. Stingless Bees. In: *Social Insects* (Ed. by Hermann, H. R.), pp. 361-423. New York: Academic Press.
- SAKAGAMI, S. F., BEIG, D., ZUCCHI, R. & AKAHIRA, Y. 1963. Occurrence of ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bees. *Rev. Bras. Biol.*, **23**, 115-129.
- SAKAGAMI, S. F., MONTENEGRO, M. J. & KERR, W. E. 1965. Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process. V. *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier. *J. Fac. Sci. Hokkaido University*, **15**, 578-607.
- SAKAGAMI, S. F. & ZUCCHI, R. 1963. Oviposition process in a stingless bee, *Trigona (Scaptotrigona) postica* Lat. (Hymenoptera). *Studia Entomol*, **6**, 497-510.
- SAKAGAMI, S. F. & ZUCCHI, R. 1974. Oviposition behavior of two dwarf stingless bees *Hypotrigona (Leurotrigona) muelleri* and *H. (Trigonisca) duckeei* with notes on the temporal articulation of oviposition process in stingless bees. *J. Fac. Sci. Hokkaido University*, **19**, 361-421.
- SILVA, D. L. N., ZUCCHI, R. & W.E, K. 1972. Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *Anim. Behaviour*, **20**, 123-132.
- SIMÕES, D. 1973. Estudos sobre o polietismo de idade em *Scaptotrigona postica*, incluindo suas relações com o sistema glandular das operárias (Apidae, Meliponinae). *Ciênc. Cultura*, **25**, 347.
- SOMMEIJER, M. J. 1984. Distribution of labour among workers of *Melipona favosa* (F): age polyethism and worker oviposition. *Insectes Soc.*, **31**, 171-184.

- SOMMEIJER, M. J., BEUVENS, F. T. & VERBEEK, H. J. 1982. Distribution of labour among workers of *Melipona favosa*: construction and provisioning of brood cells. *Insectes Soc*, **29**, 222-237.
- SOMMEIJER, M. J. & BRUIJN, L. L. M. 1994. Intranidal feeding, trophallaxis, and sociality in stingless bees. In: *Nourishment and Evolution in Insect Societies* (Ed. by HUNT, J. & NALEPA, C.), pp. 391-418. Oxford, UK: Westview Press.
- SOMMEIJER, M. J., DE BRUIJN, L. L. M. & VAN DE GUCTHE, C. 1985. The social food-flow within the colony of a stingless bee, *Melipona favosa* (F.). *Behaviour*, **92**, 39-58.
- SOMMEIJER, M. J., HOUTEKAMER, J. L. & BOS, W. 1984. Cell construction and egg-laying in *Trigona nigra* var. *paupera* Prov. with notes on the adaptative significance of the typical behavior of stingless bees. *Insectes. Soc*, **31**, 199-217.
- SOMMEIJER, M. J. & VAN BUREN, N. W. M. 1992. Male production by laying workers in queenright colonies of *Melipona favosa* (Apidae, Meliponinae). In: *Biology and Evolution of Social Insects* (Ed. by BILLEN, J.), pp. 89-97. Leuven: Leuven University Press.
- STATISTICA. 2001. STATISTICA (data analysis software system) versão 6. STATSOFT Inc.
- TERADA, Y. 1974. Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona muelleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP (Dissertação de Ms.)
- VELTHUIS, H. H. W. 1993. Pollen digestion and the evolution of sociality in bees. *Bee World*, **73**, 77-89
- VELTHUIS, H. H. W., ROELING, A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2001. Repartition of reproduction among queens in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor*. In: *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV)* (Ed. by BRUIN, J.), pp. 45-49. Amsterdam.
- WALDSCHMIDT, A. M. 1995. Aspectos da divisão de trabalho em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa-UFV. (Dissertação de Ms.)
- WEBSTER, T. C. & PENG, Y. S. 1988. The evolution of food producing glands in eusocial bees (Apoidea, Hymenoptera). *J. Evol. Biol.*, **2**, 165-176.
- WHEELER, D. 1996. The role of nourishment in oogenesis. *Annu. Rev. Entomol.*, **41**, 407-431.
- WILSON, E. O. 1971. *The insect societies*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

-
- WINSTON, M. L. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge, Massachusetts Harvard University Press.
- ZUCCHI, R. 1977. Aspectos etológicos e evolutivos da bionomia dos Meliponinae (Hymenoptera , Apidae). Ribeirão Preto-SP: FFCLRP-USP (Tese L.Dc.).
- ZUCCHI, R. 1993. Ritualised dominance, evolution of queen-worker interactions and related aspects in stingless bees (Hymenoptera: Apidae). In: *Evolution of Insect Societies* (Ed. by INOUE, T. & YAMANE, S.), pp. 207-249. Tokyo: Hakuhinsha.



5. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados verificados nos três ensaios do primeiro capítulo desta tese, indicam que operárias de *M. quadrifasciata*, independentemente do *status* comportamental, são capazes de reconhecer não companheiros. Indica também, que o *status* comportamental e o grau de experiência das operárias modulam o tipo de resposta agressiva, sendo que, a existência de contra-ataques intensifica as agressões entre os indivíduos.

Encontros entre operárias de *M. quadrifasciata* de diferentes origens e *status* comportamental, em espaço neutro, exibem comportamento agressivo assimétrico, indo da total rejeição (**forr X forr**) a total aceitação (**nut X nut** e **rem X rem**).

Os resultados apresentados no segundo capítulo desta tese sugerem que operárias forrageiras e nutridoras, em *M. quadrifasciata*, reagem de forma diferenciada à presença de rainhas virgens, ou seja, em colônias formadas por operárias forrageiras a aceitação das rainhas virgens é influenciada pela idade, enquanto que, em colônias formadas por operárias nutridoras, rainhas virgens são aceitas independentemente da idade.

Restrições de ordem, tanto fisiológica quanto comportamental, foram responsáveis pela variação encontrada na sobrevivência e precocidade de rainhas quanto ao período de pré-oviposição. Estes mesmos aspectos são responsáveis, também, pela diferenciação quanto à estruturação da colônia e seu desenvolvimento no decorrer dos experimentos.

Colônias formadas por operárias nutridoras ou com população mista apresentaram os melhores resultados, tanto para o período de pré-oviposição quanto para o tempo de sobrevivência de rainhas em condições de laboratório.



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido aos vários aspectos aqui abordados, sugerimos que, operárias nutridoras são as mais indicadas para a formação de colônias em condições de laboratório. Operárias desta fase etária estão mais susceptíveis a interações trofaláticas com rainhas recém-introduzidas, o que garante a sua sobrevivência durante os primeiros dias de convivência. A formação de corte por estas operárias, durante a introdução das rainhas, indica que, durante esta fase, a rainha estabelece a sua dominância com mais facilidade, uma vez que, este comportamento foi raramente observado em operárias de outra classe comportamental. Operárias nutridoras foram as únicas capazes de realizar todas as tarefas intranidais, permitindo a estruturação e crescimento das colônias mantidas em condições de confinamento.

Embora, o período médio de pré-oviposição verificado em colônias com população mista não seja muito diferente dos encontrados para colônias formadas com população de nutridoras, a mortalidade de rainhas neste tratamento foi mais elevada. Além deste aspecto, a utilização de população mista para formação de colônias em condições de laboratório não é apropriada, devido ao alto custo impingido às colônias doadoras, já que, só é possível formar tais colônias se forem utilizadas operárias forrageiras e nutridoras de mesma origem.

A utilização de operárias recém-emergidas para a formação de colônias, em condições de laboratório, também não é apropriada, porquê, além dos custos impingidos às colônias doadoras de discos de cria, operárias recém-emergidas são privadas do contato com indivíduos de fases etárias mais avançadas. Esta privação pode levar ao desenvolvimento comportamental tardio e, possivelmente, ao retardo da ativação das glândulas exócrinas destas operárias. Como consequência, durante as primeiras semanas de vida, rainhas introduzidas em colônias com operárias recém-emergidas sofrem devido às restrições alimentares, já que necessitam do alimento glandular produzido pelas operárias e obtido através de interações trofaláticas ou das células de cria.

Embora algumas pesquisas indiquem que operárias forrageiras sejam capazes de reverter o status, tanto comportamental quanto fisiológico, a depender da necessidade da colônia, isto não ocorreu em condições de confinamento. Portanto, a incapacidade desta

fase etária de alimentar a rainha ou realizar qualquer tarefa intranidal, inviabiliza a sua utilização em experimentos que envolvam a formação de colônias em condições de laboratório.

Em suma, embasado nos conhecimentos anteriores e de posse dos dados acrescentados por esta tese, foi possível desenvolver um novo método de formação de colônias de *Melipona quadrifasciata* em condições de laboratório. Método este, que possivelmente poderá ser adaptado para a formação de colônias de outras espécies de Meliponini. Portanto, mais uma ferramenta útil em programas de conservação, tornando viáveis projetos de reintrodução de espécies do gênero *Melipona* ameaçadas ou que tenham suas populações sujeitas à endogamia, uma vez que, possibilita a produção de rainhas fisogástricas em tempo reduzido, tornando possível a prática de permuta de rainhas entre meliponicultores e/ou institutos de pesquisa. Outro aspecto a ser salientado, se refere ao uso desta espécie como polinizadores de cultivares comerciais, devido à possibilidade de multiplicação em condições de laboratório, evitando assim, a coleta indiscriminada e predatória de colônias de *M. quadrifasciata* em seu ambiente natural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSY, M.L., CAMARGO, J.M.F., KERR, W.E. & MIRANDA, I.P.A. 1984. Espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea), para coleta de pólen na região do Médio Amazonas. *Rev. Bras. Bio.*, **44**, 227-237.
- AIDAR, D.S. 1995. Multiplicação Artificial e Manejo de Colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera Apidae, Meliponinae). Viçosa- MG, Brasil: Universidade Federal de Viçosa.(Dissertação de Ms.)
- BATISTA, M.A., RAMALHO, M. & SOARES, A.E.E. 2001a. Populations of Meliponini in heterogeneous habitats in the Atlantic rain Forest, Bahia, Brasil. In: *II Seminário Mexicano sobre Abejas sin Aguijón*, pp. 57-58. Merida, México.
- BATISTA, M.A., RAMALHO, M. & SOARES, A.E.E. 2001b. Nest sites under diversity of stingless bee in the Atlantic rain forest, Bahia, Brasil. . In: *II Seminário Mexicano sobre Abejas sin Aguijón* pp. 59-60. Merida, México.
- CAMARGO, C.A. 1970. Conservação de espermatozoides de *Apis* e *Trigona*. In: *Congresso Brasileiro de Apicultura*, pp. 51-64. Florianópolis-SC.
- CAMARGO, C.A. 1972a. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae). *Rev. Bras. Biol.*, **32**, 133-138.
- CAMARGO, C.A. 1972b. Aspectos da reprodução dos Apídeos sociais. Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP. (Dissertação de Ms.)
- CAMARGO, C.A. 1972c. Mating of the social bee *Melipona quadrifasciata* under controlled conditions (Hymenoptera, Apidae). *J. Kansas Entomol. Soc.*, **45**, 520-523.
- CAMARGO, C.A. 1974. Produção de machos diplóides de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). *Cien. Cult.*, **26**, 267.
- CAMARGO, C.A. 1976. Determinação do sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Ribeirão Preto-SP: Faculdade de Medicina-USP. (Tese DS)
- CASTRO, M.S. 2002. Bee fauna of some tropical and exotic fruits: Potential pollinators and their conservation. In: *Pollinating bees: the conservation link between agriculture and Nature* (Ed. by KEVAN, P. & MPERATRIZ-FONSECA, V. L.), pp. 275-288. Brasília: Ministry of Environment.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. & KOEDAM, D. 2000. Meliponários de Jandaíra no nordeste brasileiro. *Mensagem doce*, **59**, 8-15.

- CRUZ, D.O., FREITAS, B.M., SILVA, L.A.D.A., SILVA, S.E.M.D. & BOMFIM, I.G.A. 2004. Use of the stingless bee *Melipona subnitida* to pollinate sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) flowers in greenhouse. In: *Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas*, pp. 661. Ribeirão Preto-SP.
- DEL SARTO, M.C.L., PERUQUETTI, R.C. & CAMPOS, L.A. 2005. Evaluation of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology*, **98**, 260-266.
- HEEMERT, C., VAN RUITJER, A., VAN DEN EIJNDE, J. & VAN DER STEEN, J. 1990. Year-round production of bumble bee colonies for crop pollination. *Bee World.*, **71**, 54-56.
- KAKUTANI, T., INOUE, T., TEZUCA, T. & MAETA, Y. 1993. Pollination of strawberry by the stingless bee, *Trigona minangkabau*, and the honey bee, *Apis mellifera*: an experimental study of fertilization efficiency. *Rev. Popul. Ecol.*, **35**, 95-111.
- KERR, W.E. 1969. Some aspects of the evolution of social bees. *Evol. Behav.*, **3**, 119-175.
- KERR, W.E. 1979. Papel das abelhas sociais na Amazônia. In: *Anais do Simpósio Internacional da Apimondia sobre Apicultura de clima quente*, pp. 119-129. Florianópolis- SC, Brasil.
- KERR, W.E. 1997. A importância da Meliponicultura para o país. *Biotecnol. Ciênc. Desenvolv.*, **1**, 42-44.
- KERR, W.E. 2002. Extinção de espécies: A grande crise biológica do momento e como afeta os meliponínios. In: *An. do V Encontro sobre Abelhas* (Ed. by GARÓFALO, C.A. & FREITA, G., et al.), pp. 4-14. FFCLRP, Ribeirão Preto-SP.
- KERR, W.E., CARVALHO, G.A. & NASCIMENTO, V.A. 1994a. Relatório da expedição à estação ecológica Mamirauá. In: *Projeto Mamirauá*, pp. 103: Univ. Fed. de Uberlândia.
- KERR, W.E., NASCIMENTO, V.A. & CARVALHO, G.A. 1994b. Há salvação para os meliponíneos? In: *An. do 1o. Encontro sobre abelhas de Ribeirão Preto*, pp. 60-65. Ribeirão Preto-SP.
- MACFARLANE, R.P., GRIFFIN, R.P. & READ, P.E. 1983. Bumble bee management options to improve “ Grasslands pawera” red clover seed yield. In: *Proc. N.Z. Grassl. Assoc.*, pp. 47-53. New Zealand.

- MACIAS, M.J.O., QUEZADA-EUAN J.J.G., PARRA-TABLA V. & REYES O.V. 2001. Comportamiento y eficiencia de polinización de las abejas sin aguijón (*Nannotrigona perilampoides*) en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* M) bajo condiciones de invernadero 10 en Yucatan. In: *II Seminario Mexicano sobre abejas sin aguijón*, pp. 119-124. Mérida, Yucatán, México.
- MAETA, Y., TEZUKA, T., NADANO, H. & SUZUKI, K. 1992. Utilization of the Brazilian stingless bee, *Nannotrigona testaceicornis* as a pollinator of strawberries. *Honey bee Sci.*, **13**, 71-78.
- MALAGODI-BRAGA, K.S. & KLEINERT, A.M.P. 2004. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be used as strawberry pollinator in greenhouses? *Aust. J. of Agric. Res.*, **55** 771-773.
- MELO, G.A.R., BUSCHINI, M.L. & CAMPOS, L.A.O. 2001. Ovarian activation in *Melipona quadrifasciata* queens triggered by mating plug stimulation (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, **32**, 355-361.
- MICHENER, C.D. 1974. *The Social Behavior of the Bees*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- MICHENER, C.D. 2000. *The Bees of the World*. Baltimore, London: The Johns Hopkins University Press.
- NASCIMENTO, V.A. 1996. Aspectos biológicos, ecológicos e genéticos da *Melipona (Michmelia) capixaba*. Moure & Camargo 1994 (Hymenoptera Apoidea). Uberlândia-MG: Universidade Federal de Uberlândia.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1970. *A criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Chácaras e Quintais.
- PEDRO, S.R.M. & CAMARGO, J.M. 1991. Interactions on floral resources between the Africanized honey bee *Apis mellifera* L. and the native bee community (Hymenoptera, Apoidea) in a natural "cerrado" ecosystem in southeast Brazil. *Apidologie*, **23**, 397-415.
- POMEROY, N. 1988. A review of kiwi fruit pollination: Where to Next. *New Zel. J. Experim. Agric.*, **16**, 385-389.
- POMEROY, N. & RICHARD, M.F. 2002. Pollination of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by bumble bees (*Bombus terrestris*): effects of bee density and patterns of flower visitation. *New Zel. Entomol.*, **25**, 41-49.
- RICHARDS, K.W. 1984. Alfalfa leafcutter bee management in Western Canada. *Research Branch. Agriculture Canada*, **1495E**, 1-30.

- ROUBIK, D.W. 1989. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. New York: Cambridge University Press.
- SAKAGAMI, S.F. 1982. Stingless Bees. In: *Social Insects* (Ed. by HERMANN, H.R.), pp. 361-423. New York: Academic Press.
- SLAA, E.J., SANCHEZ, L.A., SANDI, M. & SALAZAR, W. 2000. A scientific note on the use of stingless bees for commercial pollination in enclosures. *Apidologie*, **31**, 141-142.
- YOKOYAMA, S. & NEI, M. 1979. Population dynamics of sex-determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. *Genetics*, **91**, 609-626.