

GEISYANE FRANCO DA LUZ TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS DE CRIA E O PROCESSO DE
APROVISIONAMENTO E OVIPOSIÇÃO EM *Plebeia lucii* MOURE, 2004
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

T266p
2016
Teixeira, Geisyane Franco da Luz, 1989-
Produção de células de cria e o processo de provisão e oviposição em *Plebeia lucii* Moure, 2004 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) / Geisyane Franco da Luz Teixeira. - Viçosa, MI, 2016. x, 57f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.52-57.

1. Abelha sem ferrão. 2. *Plebeia lucii*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.79

GEISYANE FRANCO DA LUZ TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS DE CRIA E O PROCESSO DE
APROVISIONAMENTO E OVIPOSIÇÃO EM *Plebeia lucii* MOURE, 2004
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2016.

Lucio Antonio de Oliveira Campos

Maria Augusta Lima Siqueira

José Eduardo Serrão
(Orientador)

*A Edilberto dos Anjos Teixeira, meu “melhor amigo menino” e
expressão viva de João 15.13 e a toda minha família.*

Dedico

*“... e se clamares por inteligência, e por entendimento alçares a voz,
se buscares a sabedoria como a prata e como a tesouros escondidos a procurares,
então, entenderás o temor do Senhor e acharás o conhecimento
de Deus.” (Provérbios de Salomão 2:3-5)*

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu continuasse a conhecer e questionar coisas maravilhosas e instigantes. Estudar a vida me mostra diariamente o quanto eu subestimo o Seu poder e criatividade.

À minha família, especialmente à vovó Luiza Franco, mamãe Marta Franco, manas Giselle Ramos e Cristiane Oliveira, cunhados Lewnardo Oliveira e Diego Ramos, sobrinhos Carlos Miguel e Rodrigo, por todo o apoio na vida e nos estudos, mesmo a 2.700 km de distância.

Ao meu marido, Edilberto Teixeira, pelo incentivo para eu ingressar na pós-graduação e por ter deixado quase tudo pra trás para me apoiar no processo.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela excelência.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao Prof. José Eduardo Serrão pela orientação e exemplo de profissionalismo e eficiência.

Ao Prof. Lucio Campos pelos conselhos, atenção, artigos, colônias e exemplo vivo de que ler nunca é demais.

Ao Prof. Weyder Santana pela atenção, artigos, troca de ideias e solicitude no empréstimo dos materiais necessários pra realização das filmagens e disponibilização de outros materiais e espaço no Apiário Central.

Aos técnicos do Apiário Central: Íris Stanciola, Geselmino Correia (Lulu), Geraldo Paiva (Cabrito), Geraldo Ferreira (Seu Ferreira), Antônio Alves (Toninho Alves) e Antônio Araújo (Toinho Gaiola) pelo apoio, atenção, café e conversas. Sem vocês teria sido trancada mais vezes naquela salinha das plebeias.

Ao laboratório de Ecotoxicologia na pessoa do Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes pela disponibilização do sistema de radiografia, e a Nelsa Guedes e Conrado Denadai pela solicitude e atenção na obtenção das imagens.

A Luís Carlos Martinez pelo apoio na análise dos dados.

Às Profas. Lenira Lacerda e Gisele Azevedo pelos conselhos em decisões importantíssimas para meu desempenho profissional e acadêmico. Suas influências sobre mim serão para sempre.

A Raissa Santana pelo apoio e amizade desde a graduação, de São Luís à Viçosa, a sua parceria tornou tudo mais divertido, possível e ratífico.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular e Apiário Central pelo apoio.

Aos meus amigos Andréa Dias, Liúdes Campos, Adriana Santos, Paula Cristina Bezerra, Aline Barros, Alinne Sá, Agostinho Pereira, Daniella Corrêa, Cristiane Marques, Eridiane Moura, Quezia Mendes, Samuel Mendes, Amanda Balbino, pelo companheirismo e amizade que levarei para a vida toda.

Aos meus pastores Paulo e Francisca Canavieira, e Oseas e Joceli Valadares pelas intercessões, conselhos e amizade.

A mim mesma, por ter sobrevivido à saudade e às pressões internas e externas. É importante ver que ainda estou aqui ao fim desta etapa.

BIOGRAFIA

GEISYANE FRANCO DA LUZ TEIXEIRA, filha de Marcos A. M. da Luz e Severina Marta S. Franco, neta de Luiza Maria de S. Franco, casada com Edilberto dos A. Teixeira, nasceu em 28 de abril de 1989 em São Luís, Maranhão. Estudou nas escolas Jardim Escola Gênese, Unidade de Ensino Básica Professor Nascimento de Moraes, Escola Comunitária Pequeno Operário e Escola Supremo Redentor onde cursou o Ensino Fundamental. Em 2005, ingressou para o Centro de Ensino Liceu Maranhense onde concluiu os dois últimos anos do Ensino Médio. Em 2007.2, ingressou no curso Ciências Biológicas na Universidade Federal do Maranhão (Campus Bacanga) onde obteve o título de bacharela e licenciada em abril de 2013. Em 2014.1, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa defendendo dissertação de mestrado em fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

	RESUMO	ix
	ABSTRACT	x
1	INTRODUÇÃO	01
2	MATERIAL E MÉTODOS	05
	2.1 ABELHAS	05
	2.2 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	05
	2.2.1 Colônia com rainha	07
	2.2.1.1 Eventos do Processo de Aprovisionamento e Postura (POP)...	08
	2.2.2 Determinação da idade de operárias	08
	2.2.3 Colônia órfã	09
	2.3 SELEÇÃO DE COLÔNIAS PARA ANÁLISE DOS DADOS	10
	2.4 ANÁLISE DE CÉLULAS POR MEIO DE RADIOGRAFIAS	11
	2.5 ESTATÍSTICA	11
3	RESULTADOS	12
	3.1 COLÔNIA COM RAINHA.....	12
	3.1.1 Comportamentos não envolvidos no POP	14
	3.1.2 Construção de células	14
	3.1.3 Comportamento antes do aprovisionamento	15
	3.1.4 Aprovisionamento, oviposição da rainha e operculação	16
	3.1.5 Ovos tróficos	18
	3.2 COLÔNIA ÓRFÃ.....	19
	3.2.1 Produção de células auxiliares (ACA)	19
	3.2.1.1 Eventos da Adição de Célula Auxiliar (ACA)	20
	3.2.1.2 Raios-X de células auxiliares	26
	3.2.2 Produção de células para aprovisionamento e postura por operárias em colônias órfãs (POPw)	29
	3.3 POP e ACA.....	34
4	DISCUSSÃO	36
	4.1 COLÔNIAS COM RAINHA.....	36
	4.1.1 Comportamentos não envolvidos no POP	36
	4.1.2 Construção de células	38
	4.1.3 Comportamento antes do aprovisionamento	39
	4.1.4 Aprovisionamento, oviposição da rainha e operculação	40

4.1.5	Postura por operárias	43
4.2	ADIÇÃO DE CÉLULAS AUXILIARES (ACA).....	44
4.3	POPE ACA	47
4.4	PRODUÇÃO DE CÉLULAS PARA APROVISIONAMENTO E POSTURA POR OPERÁRIAS EM COLÔNIAS ÓRFÃS (POP _w)	48
5	CONCLUSÃO	51
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

TEIXEIRA, Geisyane Franco da Luz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Produção de células de cria e o processo de provisionamento e oviposição em *Plebeia lucii* Moure, 2004 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**. Orientador: José Eduardo Serrão.

Comportamentos como os processos de provisionamento de célula de cria com alimento e postura de ovos pela rainha (POP) e o de oviposição por operárias são utilizados para análises comparativas entre espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini). A produção de novas rainhas através da adição de célula auxiliar a outra célula de cria pré-existente foi relatada para espécies de Meliponini, o que pode contribuir para estas análises. Este estudo descreve os comportamentos de construção e provisionamento de células de cria e auxiliar em sete colônias de *Plebeia lucii* Moure (Apidae: Meliponini) inicialmente com e, posteriormente, sem rainha. Os resultados mostram que o POP em *P. lucii* é Predominantemente Singular e não envolve atos agressivos e hipnóticos que caracterizam o gênero. A operculação é feita desde o início sem rotação. Não houve alimentação da rainha por trofalaxis ou ovos tróficos. Colônias órfãs produziram altas taxas de células auxiliares. Estas construções foram diferentes do observado no mesmo processo em outras espécies ou da simples perfuração de célula vizinha o que pode indicar origem independente deste comportamento. Dois tipos de ovos (funcionais e tróficos) foram colocados, por operárias em colônias órfãs, com oofagia, apenas, de ovos tróficos. Células auxiliares e aquelas construídas durante o POP foram operculadas mesmo na ausência de postura enquanto que células construídas e provisionadas por operárias em colônias órfãs foram imediatamente esvaziadas quando a oviposição não foi realizada. *Plebeia lucii* apresentou diferenças das demais espécies do gênero nos aspectos comportamentais de padrão de postura do POP, reação hipnótica por operárias, modo de alimentação da rainha, forma de operculação das células, reprodução por operárias e modo de produção de rainhas. Posturas de dois tipos de ovos por operárias em colônias órfãs indicam ser *P. lucii* uma espécie promissora para estudos de mecanismos de ativação de ovários e produção de ovos tróficos e funcionais por esta casta. As descrições apresentadas podem ser úteis para novos estudos filogenéticos com caracteres comportamentais mais detalhados em *P. lucii*.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Geisyane Franco da Luz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Brood cell production and the provisioning and oviposition in *Plebeia lucii* Moure, 2004 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**. Adviser: José Eduardo Serrão.

The cell Provisioning and Oviposition Process (POP) and oviposition of workers of stingless bees (Meliponini) are complex behaviors that provide elements for comparative analysis in taxa. Rearing of new queens by the auxiliary cells addition by workers in Meliponini species can contribute to these analyses. In this study, the behavior of construction and provisioning of brood and auxiliary cells was described in seven colonies of *Plebeia lucii* Moure (Apidae: Meliponini) in presence of queen and queen less condition. The results showed that in *P. lucii* the POP is predominantly singular and doesn't display aggressive and hypnotic acts that characterize the genus. The operculum occurs since the beginning without rotation. There was no nutrition for the queen by trophallaxis or trophic eggs. Orphan colonies had high rates of adding auxiliary cells. The auxiliary cell addition in *P. lucii* involves specific behavioral sequences which building were different than other species or just drilling neighbor cells. Workers laid two types of eggs (functional and trophic) with oofagia of only trophic eggs. Provisioned male cells were closed when they received egg. Auxiliary cells and those built during the POP were operculated in the oviposition failure while cells built and provisioned by workers in orphaned colonies were immediately emptied when oviposition was not performed. *Plebeia lucii* showed differences from other species of the genus in behavioral aspects of the POP standard posture, hypnotic reaction by workers, the queen's feeding, cells operculum, reproduction by workers and queens production. Posture of the two types of eggs by workers in orphaned colonies indicates that *P. lucii* like promising species for studies of ovarian activation mechanisms and production of trophic and functional eggs by this caste. These descriptions may be useful for new phylogenetic studies with more detailed behavioral characters in *P. lucii*.

1. INTRODUÇÃO

A produção de novas células de cria em Meliponini envolve uma sequência comportamental complexa conhecida por processo de aprovisionamento e oviposição (POP). Este processo possui características universais e comportamentos espécie-específicos, úteis para análises comparativas e reconstrução filogenética em abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) (DRUMOND et al. 2000; NOLL & ZUCCHI 2010). Nele ocorre a construção e aprovisionamento massal das células de cria por operárias, seguido por postura pela rainha e operculação pelas operárias. O padrão geral do POP apresenta períodos longos de construção alternados por curtos períodos de aprovisionamento, postura e fechamento de células (SAKAGAMI & ZUCCHI 1963; SAKAGAMI et al. 1965).

Rainhas de abelhas sem ferrão são as principais reprodutoras e morfologicamente especializadas na postura de ovos, mas operárias podem ativar os ovários e realizar postura. Operárias colocam ovos haploides funcionais (originam machos se colocados dentro de células de cria com alimento) ou tróficos (servem de alimento para a rainha e operárias) (SAKAGAMI et al. 1963; BEIG 1972; LACERDA & SIMÕES 2006). Ovos de operárias podem variar, entre si e entre os provenientes da rainha, em função (reprodutiva ou alimentar) e morfologia (formato, coloração, distribuição de vitelo, tamanho, número de orifícios da micrópila e presença ou ausência de retículo coriônico) (KOEDAM et al. 2001; LACERDA & SIMÕES 2006; PEREIRA et al. 2006).

As diferentes espécies de Meliponini variam quanto à capacidade das operárias em ativar os ovários e realizar postura. Em *Frieseomelitta* Ihering (SAKAGAMI et al. 1963; ZUCCHI et al. 1999; CRUZ-LANDIM 2000) e *Tetragonula carbonaria* Smith (NUNES et al. 2015) operárias não ativam ovários. Em *Leurotrigona muelleri* Friese ocorre ativação de ovários apenas em orfandade (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974; CRUZ-LANDIM 2000). Há espécies nas quais apesar de haver ativação, operárias não realizam postura, como em *Trigona cilipes cilipes* Fabricius (SILVA-MATOS et al. 2006). Outras colocam apenas ovos tróficos, como em *Geotrigona mombuca* Smith (LACERDA et al. 1998; LACERDA & ZUCCHI 1999). Em muitas espécies, ovos

tróficos e funcionais são colocados frequentemente mesmo na presença da rainha, como em *Scaptotrigona postica* Latreille (BEIG 1972; BEGO 1982; LACERDA et al. 2010).

Em *Melipona* Illiger (Apidae: Meliponini), rainhas e operárias se desenvolvem em células de cria do mesmo tamanho, sendo diferenças genéticas das larvas e de qualidade do alimento responsáveis pelo desenvolvimento diferenciado de cada casta (MICHENER 1974; JARAU et al. 2010; SCHWANDER et al. 2010). Nos demais gêneros de abelhas sem ferrão, as rainhas se originam, normalmente, de larvas que receberam maior quantidade de alimento que as que originam as operárias e os machos (determinação trófica de castas).

A maior quantidade de alimento pode ser conseguida por dois processos. No primeiro, rainhas são produzidas em células construídas maiores que as de operárias (células reais ou realeiras). No segundo, uma larva criada em uma célula de tamanho igual aquelas nas quais operárias se desenvolvem, após consumir o alimento de sua célula, pode perfurar uma contígua à sua e consumir ali alimento estocado, alimentando-se com o dobro de alimento em relação ao consumido por uma larva de operária (ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA 1990; HARTFELDER et al. 2006).

Em *L. muelleri* e *Austroplebeia australis* Friese a produção de rainhas, em qualquer condição da colônia, pode ser realizada através da perfuração de paredes entre quaisquer células vizinhas (TERADA 1974 apud TEIXEIRA 2007; TEIXEIRA 2012). Larvas de *Frieseomelitta varia* Lepeletier e *Frieseomelitta languida* Moure, em colônias órfãs, perfuram células específicas que são adicionadas a outras preexistentes. A célula adicionada é denominada “célula auxiliar” e se caracteriza por conter alimento, não receber postura e ter alimento extra para a larva da célula adjacente (FAUSTINO et al. 2002; FADIL et al. 2012).

Em *Plebeia lucii* Moure e *Frieseomelitta silvestrii* Friese há produção de rainhas pela adição de células auxiliares tanto em colônias órfãs como em colônias com rainha. Na primeira, apenas células com larvas em idades específicas que estejam no final da fase de alimentação e que ainda não tenha iniciado a defecação, são escolhidas para receberem a célula auxiliar (TEIXEIRA 2007; 2012).

Todas estas espécies (*L. muelleri*, *A. australis*, *F. varia*, *F. languida*, *P. lucii* e *F. silvestrii*) possuem em comum o fato de suas células de cria ser dispostas em cacho. No entanto, comportamento de perfuração de célula contígua foi recentemente descrito para *T. carbonaria* que dispõem seus favos em espiral, mas modificam para a disposição irregular quando sem rainha. Em colônias órfãs operárias adicionam célula auxiliar a outra célula de cria preexistente, sendo aquela caracterizada por ter tamanho semelhante ao de uma realeira e não possuir postura. A larva perfura a parede entre as duas e consome o alimento adicional. Mudanças na disposição das células de cria para um formato mais aberto deve-se, provavelmente, a um epifenômeno pela necessidade das abelhas em construir células de rainha com uso de células auxiliares (NUNES et al. 2015).

Tetragonula carbonaria e *A. australis* compartilham o fato de possuírem células anexas diferenciadas no tamanho em relação às demais células de cria o que não é observado em *Plebeia* Schwarz e *Frieseomelitta*. Em *T. carbonaria* as células grandes nunca recebem postura, uma vez que as operárias não ativam os ovários mesmo em colônias órfãs, enquanto que em *A. australis* estas células só não recebem postura enquanto as operárias não ativam os ovários (NUNES et al. 2015; TEIXEIRA 2012).

Se o comportamento de construção de célula de rainha for considerado como homólogo nas filogeograficamente distantes *L. muelleri*, *T. carbonaria* e *A. australis*, nas quais as larvas perfuram uma célula vizinha, então ele é o mais provável estado ancestral da produção de rainhas em abelhas sem ferrão (NUNES et al. 2015).

Os mecanismos trofogenético ou trófico de determinação de castas não explicam a formação de rainhas miniaturas ou anãs em nove espécies de Meliponini, sendo seis delas espécies de *Plebeia*. Estudos já verificaram que, rainhas miniaturas podem estabelecer novas colônias e apresentar taxas de postura semelhantes às de rainhas de maior tamanho (RIBEIRO et al. 2006a; 2006b).

Embora com flutuações sazonais, colônias de Meliponini normalmente produzem novas rainhas o ano inteiro, as quais podem substituir a rainha estabelecida, enxamear acompanhada por algumas operárias, ser mortas ou mesmo permanecer em celas de aprisionamento dentro da colônia por tempo indeterminado (MICHENER

1974; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI 1995; RIBEIRO et al. 2003; RIBEIRO et al. 2006a).

Colônias de *Apis mellifera* Linnaeus (Apidae: Apini) produzem rainhas apenas em períodos de formação de colônias filhas ou perda da rainha estabelecida. Essa produção envolve a escolha de larvas jovens em idade específica que passam a receber porções extras de geleia real, resultando na produção de “rainhas de emergência” (FELL & MORSE 1984). Isto é possível porque larvas dessa abelha recebem alimentação progressiva e a célula de cria permanece aberta durante a maior parte do período de alimentação larval (MICHENER 1974).

Em abelhas sem ferrão, a seleção de larvas para se tornarem rainhas em situações de orfandade era considerada improvável devido ao aprovisionamento massal da cria, à célula permanecer fechada durante todo o desenvolvimento larval e à forte desorganização sócio-comportamental, normalmente, registrada em colônia sem rainha. No entanto, *F. varia*, *P. lucii* e *T. carbonaria* produzem rainhas de emergência pela adição de células auxiliares (FAUSTINO et al. 2002; TEIXEIRA 2007; NUNES et al. 2015).

Abelhas *Plebeia* são pequenas (três a seis milímetros de comprimento) com marcas claras ou amarelas na face e tórax (MICHENER 2007). *Plebeia lucii* mede aproximadamente 3,00 mm e possui células de cria dispostas em forma de cacho (MOURE 2004).

Em espécies de Meliponini ainda não estudadas, pesquisas sobre os ritualizados processos comportamentais envolvidos na produção de cria, a ativação dos ovários de operárias, o processo de substituição de rainhas, entre outros, contribuem para discussões sobre evolução e determinação de castas no referido grupo. Neste contexto, este estudo investiga aspectos reprodutivos de colônias de *P. lucii* através da descrição dos processos comportamentais envolvidos na produção de novas rainhas, atividades de postura por operárias e POP.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ABELHAS

Sete colônias de *P. lucii* mantidas no Apiário da Universidade Federal de Viçosa e acondicionadas em caixas de observação de madeira com dimensões variadas (9 x 12 x 7,5 cm; 16 x 16,5 x 6,5 cm; 11,5 x 14 x 7 cm) e tampa de vidro, foram mantidas em sala fechada (24° - 28°C) e conectadas a parede por tubo plástico de modo que permitia livre acesso das abelhas ao ambiente externo. As colônias foram regularmente alimentadas com mel puro de *A. mellifera* e pólen de *F. varia* ou *Friesella schrottkyi* Friese.

Foram utilizadas as colônias S/N3, PL6, PL48, PL37, PL57, FR1-29 e PL56 doravante denominadas, respectivamente, colônias I, II, III, IV, V, VI e VII. O critério utilizado para escolha das colônias foi presença de quantidades de alimento estocado e de células de cria.

2.2 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

As mesmas colônias foram acompanhadas em duas diferentes etapas, iniciadas sucessivamente no menor espaço de tempo possível para evitar influências de variações ambientais. Na primeira etapa, as colônias foram monitoradas sem sofrer qualquer manipulação, enquanto que a segunda foi realizada após a retirada da rainha fisogástrica. Os períodos foram demarcados pelo início da observação de processos de provisionamento e postura (POP) em uma colônia (Fig. 1).

Registros comportamentais foram feitos em observações diretas a intervalos variáveis para detecção da construção de célula auxiliar. Uma vez detectada, esta foi observada diretamente e registrada em vídeo (Sony Handycam modelos DCR-DVD610 e DCR-TRV460 com lentes de amento). As observações diretas e algumas filmagens foram feitas com luz branca e as colônias permaneceram em ausência de luz nos intervalos. Filmagens foram feitas, também, em modo NIGHTSHOT.

Em todas as observações de comportamentos envolvendo construção de células, registrou-se a fase de construção em que a célula se encontrava quando começou a ser acompanhada (Fig. 2).

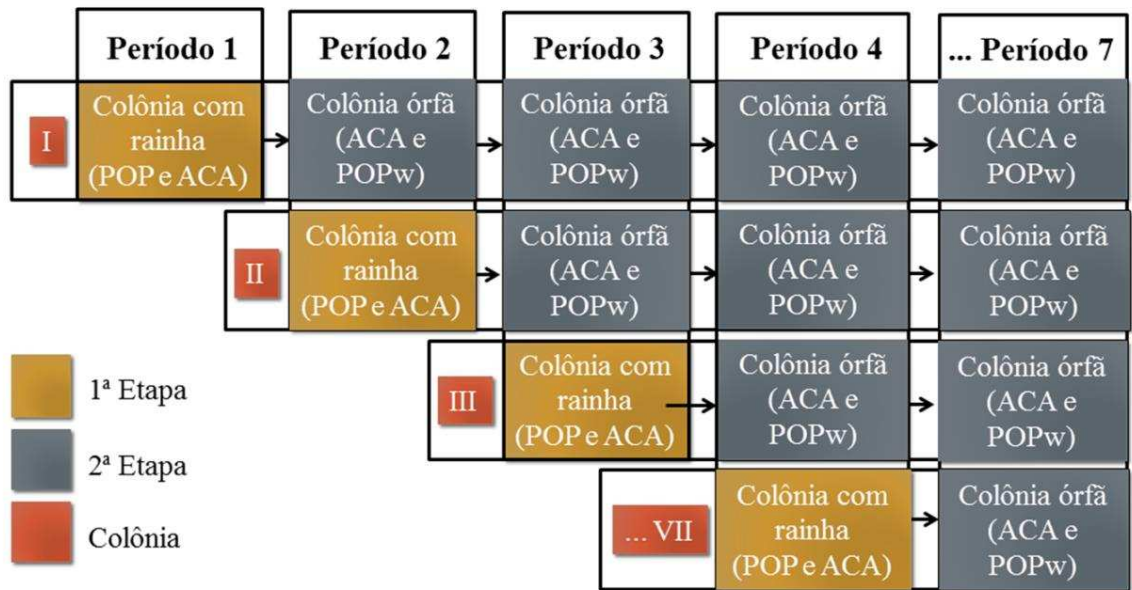


Figura 1 – Períodos de observação iniciados sucessivamente em sete colônias de *Plebeia lucii* e composto por duas diferentes etapas (1ª etapa: com rainha; 2ª etapa: sem rainha). (POP): Processo de Aproveitamento e Postura; (ACA): Processo de Adição de Célula Auxiliar; (POPw): Processo de Aproveitamento e Postura por operárias em colônias órfãs. A 1ª etapa durou por dias suficientes para obtenção de número mínimo de POPs, enquanto a 2ª etapa durou até o fim da realização do estudo.

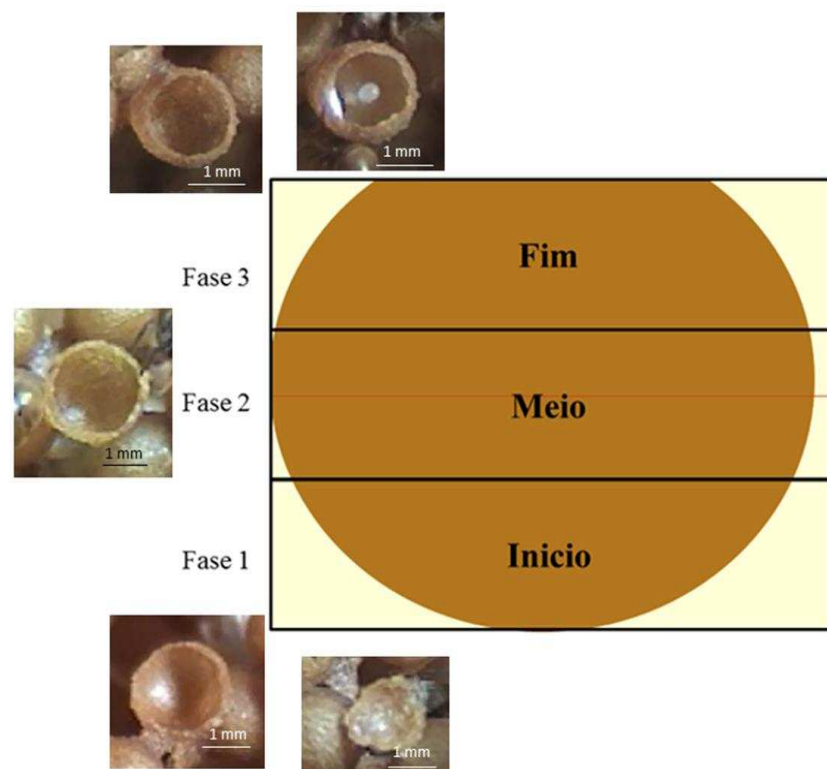


Figura 2 – Classificação adotada para as fases de construção de células de cria em colônias de *Plebeia lucii*. Fase 1: início da construção; Fase 2: meio da construção; Fase 3: final da construção.

2.2.1 Colônia com Rainha

Nesta etapa experimental, denominada “Colônia com Rainha”, registrou-se aspectos comportamentais relacionados ao processo de aprovisionamento e postura (POP) e construção de célula auxiliar. As colônias foram monitoradas por cerca de 8 horas diárias e os registros foram feitos apenas quando atividades relacionadas ao POP e célula auxiliar se iniciavam. A colônia VII perdeu sua rainha após início das observações e, por isto, nela não houve registro de POP (Tab. 1).

Tabela 1 – Total de dias de monitoramento e tempo de filmagem para registro de Processos de Aprovisionamento e Postura (POP) em seis colônias de *Plebeia lucii*.

Colônia	Período de observação de POP	Dias de observação	Tempo de filmagem
I	29/01 a 06/02/15	08	1 h 14 min 15 s
II	25 a 29/02/15	04	42 min 31 s
III	12 a 14/03/15	02	1 h 23 min 39 s
IV	22/04 a 05/05/15	13	21 h 25 min 35 s
V	21/02 a 01/04/15	39	50 min 36 s
VI	06 a 13/05/15	07	16 h 47 min 09 s
	Total		43 h 57 min 05 s

Não houve qualquer manipulação das colônias, exceto pelo bloqueio, em alguns casos, das atividades de forrageio das campeiras, e todas foram mantidas nas caixas originais. Algumas colônias pararam seus POPs enquanto estavam sendo monitoradas e, nos casos em que a atividade de forrageio estava sendo impedida, as colônias foram colocadas para fora da sala de observação para as entradas serem liberadas. Algumas filmagens foram feitas nestas condições (temperatura ambiente).

Registros diretos a cada 10 minutos eram realizados a partir do momento em que atividade de operárias nas células em construção era detectada e se seguiam até que alguma das células estivesse na fase final da construção. Os registros então passaram a ser feitos através de filmagens até o fim da fase de operculação. Filmagens contínuas incluindo período extraoviposição foram realizadas apenas nas colônias IV e VI.

No mínimo dois POPs foram registrados por colônia e não houve exigências em relação ao um número mínimo de construção de célula auxiliar nesta etapa, uma vez que é um evento mais raro ou difícil de ser observado em colônias com rainha e com as células de cria sobrepostas.

2.2.1.1 Eventos do Processo de Aprovisionamento e Postura (POP)

As definições e terminologias dos eventos do processo de provisionamento e postura de células utilizadas neste estudo seguem o proposto por SAKAGAMI & ZUCCHI (1974) com algumas modificações sugeridas posteriormente por DRUMOND et al. (1997).

Neste estudo foram feitas as seguintes modificações nas nomenclaturas clássicas: 1- Denominou-se “Fase de Construção” o momento desde a detecção de atividade de operárias na construção células até o início da Espera Pré-descarga; 2- A Subfase de Pós-descarga incluiu a Inspeção/Ingestão de Alimento uma vez que em *P. lucii* mesmo após a Inspeção mais regurgitações ocorreram; 3- A inspeção e a postura foram medidas separadamente; 4- Como *P. lucii* não opercula a célula através de rotação, foram delimitadas as Subfases de Pré-operculação e Operculação Principal.

Além da duração dos eventos do POP, registrou-se também o número de:

- ❖ Operárias envolvidas na construção das células a cada 10 minutos;
- ❖ Inserções de rainhas e operárias na fase de pré-provisionamento;
- ❖ Operárias inserindo-se na célula no período de descarga;
- ❖ Operárias no início, meio e fim da operculação.

2.2.2 Determinação da idade de operárias

Após o registro mínimo de POPs em cada colônia, células de cria com pupa foram retiradas e colocadas em placas de Petri com algumas operárias nutridoras e mantidas à temperatura controlada (24°-28 °C). À medida que emergiram as abelhas adultas foram marcadas com tinta guache de modo que os padrões de cores foram usados para identificação da idade dos indivíduos.

2.2.3 Colônia Órfã

Após o registro de POPs e marcação de cerca de 20 operárias, a segunda etapa foi iniciada, sucessivamente, em cada colônia pela retirada da rainha fisogástrica para estimular a produção de rainhas de emergência e postura por operárias. Nela foram feitos registros dos aspectos comportamentais relacionados ao Processo de Adição de Célula Auxiliar, doravante denominado ACA, e ao processo de construção de célula para postura por operárias, aqui denominado POPw (*Provisioning and Oviposition Process by Workers*). As colônias foram transferidas para caixas maiores (16 x 16,5 x 6,5 cm), as células de cria espalhadas para facilitar a observação das atividades sobre as células de cria e as operárias marcadas inseridas em suas respectivas colônias órfãs.

Rainhas virgens encontradas em celas de aprisionamento foram transferidas para solução de Zamboni (STEFANINI et al. 1967) e casulos reais existentes foram retirados e mantidas em placas de Petri, à 24°-28 °C, até emergência das rainhas que foram fixadas em Zamboni.

Nesta etapa, 12h42min30s de filmagens foram realizadas e cada colônia monitorada durante oito horas diárias por mais que 50 dias, com exceção à colônia VI devido ao encerramento das observações por causa da redução natural na temperatura ambiente (Tab. 2). A colônia IV não passou para a segunda etapa experimental e foi fonte de dados apenas para caracterização geral do POP.

Registros diretos foram realizados a cada 10 minutos a partir do momento em que atividade de construção de células era detectada. A partir da fase de aprovisionamento os registros o passavam a ser através de filmagens até o fim da fase de operculação. A possível construção de célula auxiliar era indicada por grande movimentação de operárias sobre uma célula de cria fechada e/ou manipulação da cera por operárias de modo a formar uma concavidade.

O número de novas células auxiliares era monitorado diariamente. As rainhas fisogástricas retiradas fundaram colônias cujas células novas foram retiradas e inseridas nas respectivas colônias órfãs quando não dispunham mais células de cria para possível adição de célula auxiliar.

Tabela 2 – Total de dias de monitoramento e tempo de filmagem para registro de Processos de Adição de Célula Auxiliar (ACA) em seis colônias de *Plebeia lucii*.

Colônia	Período de observação de ACA	Dias de observação	Tempo de filmagem
I	21/02 - 26/05/15	97	2 h 27 min 40 s
II	11/03 - 26/05/15	76	3 h 14 min 32 s
III	12/09 - 28/10/14	46	2 h 21 min 44 s
	18/03 - 26/05/15	69	2 h 25 min 50 s
V	02/04 - 26/05/15	55	24 s
VI	24 - 28/10/14	04	-
	19 - 26/05/15	07	2 h 12 min 20 s
VII	10/03 - 26/05/15	77	-
Total			12 h 42 min 30 s

Os casulos reais resultantes do processo de anexação de célula auxiliar foram retirados das colônias e as rainhas emergidas fixadas para posterior medição do tamanho corporal e análise morfológica.

Além da duração dos eventos do processo de construção de célula auxiliar, registrou-se também o número de operárias:

- ❖ Envolvidas na construção das células a cada 10 minutos;
- ❖ Se inserindo na célula no período de descarga;
- ❖ Envolvidas no início, meio e fim da operculação.

2.3 SELEÇÃO DE COLÔNIAS PARA ANÁLISE DOS DADOS

Sete colônias foram monitoradas nas duas etapas experimentais, mas o comportamento de construção de célula auxiliar foi descrito com base nos registros apenas nas colônias I, II, III e VI. A escolha foi feita com base no maior número de observações de eventos completos de POP, ACA e POPw nas duas etapas experimentais, o que excluiu a necessidade de sorteio por isto ter acontecido apenas nas colônias supracitadas.

2.4 ANÁLISES DE CÉLULAS POR MEIO DE RADIOGRAFIA

Células contendo auxiliares foram submetidas a um sistema de radiografia LX-60 e fotografadas com câmera digital (Faxitron X-Ray Corp., Wheeling, IL) para identificar a posição da larva em relação ao local de construção da célula auxiliar, quantidade de alimento na célula e verificar o comportamento das larvas de operária em células com célula auxiliar.

2.5 ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com o auxílio do programa Statística 7.1 (StatSof Inc. 2005).

Para correção de não normalidade da distribuição amostral dos dados quantitativos de duração de eventos do POP e ACA, que foi testada via teste Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$), utilizou-se a função de transformação $x \rightarrow \arcsen(x)$.

Análise de variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$) e teste Tukey ($\alpha = 0,05$) foram utilizados para verificar diferenças quantitativas nos comportamentos de produção de células.

3. RESULTADOS

3.1 COLÔNIA COM RAINHA

Um total de 23 POPs foi registrado nas colônias de *P. lucii* com rainha. Construções de células auxiliares apesar de terem ocorrido, o que foi evidenciado posteriormente pela existência de casulos reais formados, não foram registradas porque não ocorreram em locais passíveis de observação. Durante as observações diárias ocorreu redução na postura ao longo do tempo, o que foi expresso pela redução do número de POPs registrados no total e por colônia, cujos aspectos qualitativos e quantitativos serão descritos nas próximas seções.

Tabela 3 – Dados quantitativos de Processos de Aprovisionamento e Postura (POP) em quatro colônias de *Plebeia lucii*. Número de inserções de rainhas (Q) e operárias (W) nas fases de espera pré-aprovisionamento ($\bar{p}r$) e aprovisionamento (\bar{p}), sendo \bar{o}_i o número de inspeções após o início do aprovisionamento. Número máximo de operárias no início, meio e fim da operculação principal (\bar{s}_o). (*): número de inserções de operárias após cada inspeção da rainha.

Colônia	Célula	Nº de inserções				Nº de operárias em \bar{s}_o		
		$\bar{p}r$		\bar{p}		Início	Meio	Fim
		Q	W	Q (\bar{o}_i)	W			
I	1	0	3	1	6	1	6	6
	2	0	4	2	7+2*	1	6	6
II	3	4	4	2	3+1	1	6	6
	4	5	4	2	3+2	1	6	6
III	5	6	9	1	4	1	5	5
	6	0	1	1	3	1	6	7
	7	23	6	1	4	1	7	7
	8	13	6	1	4	2	5	7
	9	7	4	1	3	1	7	6
VI	10	2	9	4	3+2+1+1	1	6	6
	11	10	17	2	3+2	1	6	5
Valores máx. - mín.		0 - 23	1 - 17	1 - 4	3 - 9	1 - 2	5 - 7	5 - 7
Média		6,36	6,09	1,64	4,91	1,09	6	6,09
Desvio padrão		±6,95	±4,35	±0,92	±1,81	±0,3	±0,63	±0,7

Tabela 4 – Durações dos eventos de Processos de Aproveitamento e Postura (POP) em quatro colônias de *Plebeia lucii*. $\bar{p}r$: espera pré-aprovisionamento; \bar{P} : aproveitamento (\bar{p} : descarga; $\bar{p}s$: pós-descarga); \bar{o} : oviposição (\bar{o}_i : inspeção de célula; \bar{o}_p : postura); \bar{s} : operculação (\bar{s}_p : pré-operculação; \bar{s}_o : operculação principal). (*) = Apenas as células observadas desde 1/3 da construção foram consideradas. (n) = número de POPs utilizados para os cálculos. (-) = eventos não registrados.

Colônia	Data (2015)	Célula	Nível de construção	Período de Oviposição (\bar{B})								\bar{B} total (min)
				Construção (min)	$\bar{p}r$ (s)	\bar{P}		\bar{o}		\bar{s}		
						\bar{p} (s)	$\bar{p}s$ (s)	\bar{o}_i (s)	\bar{o}_p (s)	\bar{s}_p (s)	\bar{s}_o (min)	
I	04/02	1	1/3	197	8,2	13,43	1,57	0,84	12,53	0	3,86	4,33
	05/02	2	1/3	103	10,2	21	10,97	5,8	13,30	0	4,98	5,85
II	25/02	3	1/3	90,18	54,06	10	6,03	3,94	10,27	3,77	4,72	6,16
	27/02	4	3/3	-	29,43	11	2,97	2,73	10,87	5,63	3,36	3,42
III	12/03	5	3/3	-	90,2	11,27	1,66	1,4	11,14	18,57	5,07	6,94
	12/03	6	1/3	108,66	6,8	8,7	1,97	0,2	14,30	4,74	3,25	3,88
	13/03	7	1/3	55,35	193,5	15,8	2,2	1,66	14,33	11,5	3,86	7,84
	13/03	8	1/3	84	97,2	13,8	1,27	0,9	15,33	1,7	3,21	5,4
	13/03	9	1/3	108	37,5	8,83	2,44	1,1	15,30	0,17	3,55	4,62
VI	06/05	10	1/3	371,96	47,7	24	8,93	6	17,50	6,9	5,69	7,5
	06/05	11	2/3	436,84	163,47	12	3,84	2	18,67	0	5,73	9,25
Valores mínimo e máximo				55,35 - 265,96*	6,8 - 193,5	8,7 - 24	1,27 - 10,97	0,2 - 6	10,27 - 18,67	0 - 18,57	3,21 - 5,73	3,42 - 9,25
Média				126,52	67,11	13,62	3,98	2,42	13,96	4,82	4,3	5,93
Desvio padrão				±69,51	±60,22	±4,92	±3,27	±2	±2,69	±5,84	±0,97	±1,82
n				8	11							

3.1.1 Comportamentos não envolvidos no POP

Fora do POP a rainha foi visualizada predominantemente sobre as células de cria, e, menos frequentemente, sobre potes de alimento próximos às mesmas sem um lugar definido de descanso. A rainha revezou entre um descansar calmo e um deslocamento lento sobre as células de cria. Durante o descanso, ela permaneceu em um mesmo local e lentamente uma corte de operárias foi formada. Pequenos deslocamentos/avanços em direção às operárias da corte e inúmeras antenações e toques com as pernas anteriores foram frequentemente realizados. A rainha regularmente bateu as asas, sendo cada batida breve e intercalada com longos repousos de asa, com tempo e vibração das batidas aumentando quando realizava dos pequenos avanços em direção às operárias.

Quando em deslocamento, a rainha caminhou lentamente com frequentes batidas de asa caracterizadas por repousos mais curtos e vibrações da asa mais demoradas do que quando em descanso. Houve constantes avanços e antenações com operárias. A rainha realizou paradas curtas ou longas em frente a células em construção, e, em raros casos, ela ficou parada vários minutos sobre a célula em construção de modo semelhante a quando em descanso e sem realizar inserção na célula. Durante as inspeções das células a rainha manteve as asas fechadas, muito frequentemente caminhou sobre a célula com movimentos circulares e constantes batidas de asas e, logo em seguida, retornou a caminhar pelas demais células de cria.

O máximo de contato observado entre operárias e rainhas foi o antenal. Não foi observado contato bucal ou trofalaxis apesar desta terem sido comumente vistos entre operárias. Também não foram observados comportamentos ritualizados hipnóticos (“hypnotic turning”, “hypnotic head insertion” e/ou “hypnotic barricading”) (DRUMOND et al. 1996a; 1996b; 1997; 1998; SAKAGAMI et al. 1993). A resposta da operária à aproximação da rainha ou encontros inesperados foi a antenação ou rápida evasão ou distanciamento.

3.1.2 Construção de células

Nas colônias de *P. lucii* avaliadas, a construção de células foi do tipo Sucessiva (C_c) e o padrão de postura foi Predominantemente Singular (B_s). Cerca de duas ou três células estavam sendo construídas ao mesmo tempo, mas apenas uma recebeu postura

por POP. Além disso, algumas células estavam sendo construídas ao mesmo tempo em regiões distantes na caixa e a rainha visitou ambas durante as fases de patrulhamento (\bar{P}) e excitação (\bar{A}). Novas células foram construídas próximas às operculadas anteriormente.

A duração da construção das células observadas desde a Fase Inicial (Tab. 4) não variou entre as colônias ($p= 0,15$; $F= 3,103$; Teste Tukey HSD: $p > 0,05$). O número de operárias no início da construção variou de 0 a 3 enquanto que na fase final foi de 1 a 6. Após a finalização da primeira oviposição depois de um longo período de Extraoviposição, as demais células foram construídas em intervalos mais curtos de tempo e em uma atmosfera constantemente agitada.

3.1.3 Comportamento antes do provisionamento

A substituição de uma operária por outra foi gradualmente mais rápida e agitada à medida que a parte final da construção se aproximou. Operárias ficaram ao redor da célula aguardando a substituição e aumentando, assim, o número de operárias envolvidas na construção (Fig. 3 e 4A).



Figura 3 - Células de *Plebeia lucii* em construção. Do lado esquerdo uma célula no início da construção com duas operárias trabalhando nela e ao lado direito uma célula no fim da fase de construção com seis operárias ao redor aguardando revezamento.

O grau de agitação aumentou localmente com a aproximação da rainha. À medida que esta se aproximou da célula em construção, as operárias corriam velozmente inserindo rapidamente a parte anterior do corpo na célula e escapando novamente em seguida (Fig. 4B). Com a chegada e fixação da rainha na célula de cria e consequente início da espera pré-descarga, duas situações ocorreram: 1 - a rainha

inseriu inúmeras vezes sua parte anterior do corpo na célula, revezando-se neste comportamento com as operárias enquanto aguardava na borda da mesma até que ocorresse a primeira regurgitação (Fig. 4C - 4E) ou caminhou sobre a célula batendo as asas após um longo período de espera ou 2 – a rainha permaneceu fixa sem realizar qualquer inserção na célula e apenas as operárias realizaram inúmeras inserções rápidas até a primeira regurgitação.

O número de inserções de rainhas e operárias na fase de espera pré-descarga (Tab. 3) não variou entre si ($F= 0,012$; $p= 0,91$; Teste Tukey HSD: $p= 0,91$; $n= 11$ POPs) e foi semelhante entre as colônias (rainhas: $p= 0,44$; $F= 1,02$; Teste Tukey HSD: $p > 0,05$; operárias: $p= 0,054$; $F= 4,22$; Teste Tukey HSD: $p > 0,05$; $n= 4$ colônias).

A espera pré-descarga variou de poucos segundos à mais que três minutos (Tab. 4). Mesmo nos casos em que ela foi mais prolongada (acima de 90 s), não houve registro de fixação da rainha sem consequente continuidade do POP. A duração desta fase não variou entre as colônias ($F= 1,84$; $p= 0,23$; Teste Tukey HSD: $p > 0,05$; $n= 4$ colônias).

3.1.4 Aprovisionamento, oviposição da rainha e operculação

A partir da primeira regurgitação, o grau de agitação e o número de operárias próximas à célula aumentaram (Fig. 4F). A substituição de operárias entre regurgitações foi usualmente imediata, sendo que na maioria dos casos a rainha limitou o número de regurgitações ao se inserir rapidamente sobre o alimento (inspeção/ingestão de alimento) (Fig. 4G). Após essa primeira inspeção a rainha realizou a oviposição ou se colocou de lado novamente até que mais regurgitações fossem realizadas na célula (Fig. 4H - 4I). Até quatro inspeções intercaladas com mais regurgitações de operárias foram realizadas (Tab. 3).

Apesar do número de regurgitações ter variado entre as colônias ($F= 7,03$; $p= 0,016$; $n= 4$ colônias), a duração da fase foi semelhante ($F= 1,70$; $p= 0,25$; Teste Tukey HSD: $p > 0,05$; $n= 4$ colônias). Algo semelhante ocorreu para a fase de inspeção pela rainha, pois o seu número variou entre as colônias ($F= 5,64$; $p= 0,028$; $n= 4$ colônias), mas a sua duração não ($F= 2,22$; $p= 0,17$; Teste Tukey HSD: $p > 0,05$; $n= 4$ colônias).

Em um POP atípico na colônia IV a rainha demorou a realizar inspeção e operárias continuaram a se inserir na célula, totalizando 12 inserções até que a primeira inserção da rainha ocorresse. A rainha não ovipositou e realizou ainda mais três inspeções, sendo que entre elas houve um longo período de tempo durante o qual a rainha se afastou da célula e ficou fora do campo de visão de observação. Entre as inspeções, as operárias continuaram a se inserir na célula mais 98 vezes, totalizando 110 inserções até o fechamento da célula, mesmo sem postura.

Nas colônias III e VI, únicas colônias nas quais POPs subsequentes foram registrados (Tab. 4), a inspeção de célula no primeiro POP após um longo período de Extraoviposição foi sempre mais demorada do que as subsequentes (Colônia III - 12/03: 1ª célula = 1,40 s; 2ª célula = 0,20 s; 13/03: 1ª célula = 1,66 s; 2ª célula = 0,90 s; 3ª célula = 1,10 s; Colônia VI - 06/05: 1ª célula = 6 s; 2ª célula = 2 s). Na colônia VI além da duração também houve redução no número de inspeções de quatro para duas do primeiro POP para o seguinte.

A duração da oviposição pela rainha (Tab. 4) variou entre as colônias ($F= 9,29$; $p= 0,0077$; $n= 4$ colônias). A oviposição é curta e acompanhada por movimentos de antena e pernas dianteiras e curtos bater de asas.

Durante a oviposição as operárias afastaram-se da célula e, mesmo após a saída da rainha, elas mostraram evidente reação deterrente à aproximação e operculação (Fig. 4J – 4L). Neste contexto, usualmente a operculação foi iniciada após alguns segundos (ver \overline{sp} em Tab. 4) por uma ou duas operárias e este número aumentou acentuadamente com o passar do tempo, podendo ter de cinco a sete operárias do meio ao fim da operculação principal (\overline{s}_o) (Tab. 3) (Fig. 4M – 4O). Nenhum comportamento de tentativa de abertura de célula por rainha ou operárias foi registrado em todos os POPs observados.

A duração total do POP (Tab. 4) foi similar entre as colônias ($F= 1,71$; $p= 0,25$; Teste Tukey HSD: $p > 0,005$; $n= 4$ colônias).

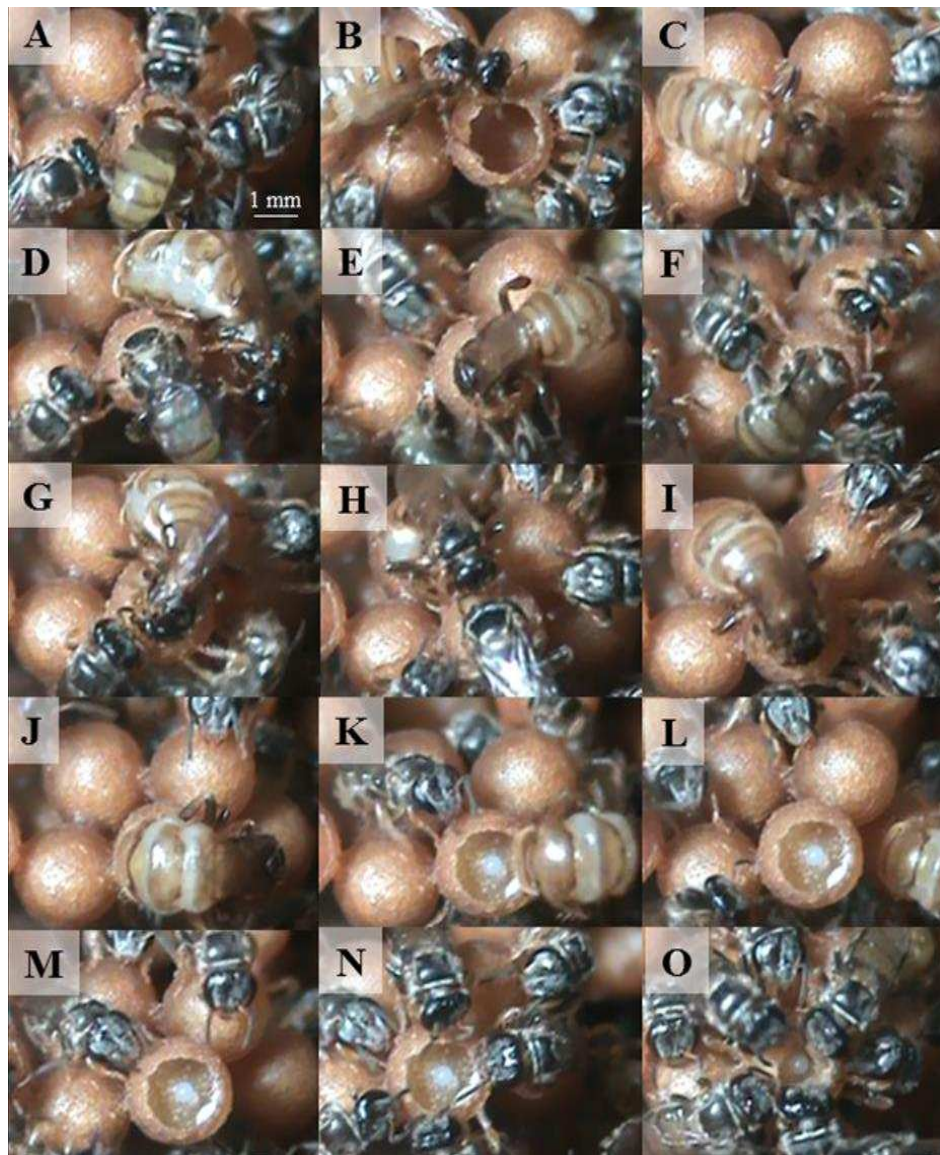


Figura 4 – Sequência comportamental de um Processo de Aproveitamento e Postura (POP) em *Plebeia lucii*. Operárias finalizando construção da célula (A) se afastam com a chegada e fixação da rainha (B). Assim que chega à célula, a rainha a inspeciona (C) e se coloca lateralmente à mesma. Operárias realizam quatro inserções sem regurgitar (D). A rainha se insere na célula outras duas vezes (E) até que ocorre a primeira regurgitação (F). Após quatro regurgitações a rainha interrompe o processo de aproveitamento ao se inserir na célula e inspecionar/ingerir alimento (G) e logo após ela se afasta e mais uma operária regurgita na célula (H). A rainha realiza mais uma inspeção/ingestão de alimento (I) e se posiciona para postura logo em seguida (J). A rainha se afasta da célula (K e L), a operculação é iniciada por uma operária (M) e até seis operárias podem trabalhar lado a lado até o seu total fechamento (N) – (O).

3.1.5 Ovos tróficos

Nenhuma postura de operária foi detectada durante todo o período de monitoramento das colônias com rainha, nem mesmo no POP atípico na colônia IV

descrito anteriormente, no qual uma célula provisionada foi abandonada pela rainha e as operárias a fecharam sem ovo e não exibiram qualquer comportamento que indicasse tentativa de postura.

3.2 COLÔNIA ÓRFÃ

3.2.1 Produção de células auxiliares (ACA)

Em resposta a condição de orfandade, as diferentes colônias de *P. lucii* construíram de sete a 17 células auxiliares por colônia ($12 \pm 3,67$; $n= 6$ colônias), sendo que nenhuma destas construções ocorreu de modo simultâneo em uma mesma colônia. Uma das colônias não gerou dados para este cálculo devido à parada nos monitoramentos como explicado na Seção 2.2 (Colônia VI; Tab. 2). Após a retirada da rainha, o período até o aparecimento da primeira célula auxiliar variou de um a seis dias ($2,85 \pm 1,77$; $n= 7$ colônias). A adição de novas células de cria nas colônias órfãs estimulou a retomada do comportamento de adição de célula auxiliar quando este havia cessado por dias seguidos.

Em três registros de construção de célula auxiliar na colônia II havia operárias marcadas e suas idades variaram entre seis e 19 dias, sendo mais frequente operárias de seis a nove dias de idade, sendo que algumas operárias trabalharam na célula do início ao fim da construção e participaram de todo o processo de provisionamento e operculação.

Casos atípicos de construção de célula auxiliar foram observados, conforme segue (Fig. 5):

- ❖ Interrupção da construção da célula auxiliar, e nestes casos a construção parou ainda na fase de formação de concavidade ou elevação inicial das paredes;
- ❖ Mudança do local de construção, podendo resultar em célula com duas células auxiliares em formação;
- ❖ Célula auxiliar fechada vazia;
- ❖ Célula com duas células auxiliares adicionadas;
- ❖ Célula auxiliar esvaziada;
- ❖ Construção de célula auxiliar em célula com larva de macho (oriunda de oviposição por operária).



Figura 5 – Casos atípicos de construção de célula auxiliar em colônias órfãs de *Plebeia lucii*. (A): célula não concluída. (B): célula com duas células auxiliares em construção. (C): célula com duas células auxiliares adicionadas. (D): célula auxiliar esvaziada. (E): célula auxiliar sendo fechada vazia. (F): célula auxiliar adicionada à célula com larva filha de operária.

3.2.1.1 Eventos da Adição de Célula Auxiliar (ACA)

Um total de 11 eventos completos de ACA foi registrado em quatro colônias órfãs de *P. lucii* (Tab. 5), com diferença entre as colônias na duração total deste evento ($F= 5,14$; $p= 0,034$). As fases deste processo em *P. lucii*, com suas respectivas definições, terminologias e caracterizações, são propostas a seguir (Fig. 6):

❖ **Fase de Aglomeração de Operárias (\bar{A}_g):** foi caracterizada pelas primeiras atividades na célula que receberia a célula auxiliar. Usualmente ela foi marcada por um aglomerado de operárias com alto grau de excitação. Estas realizaram antenação com a célula e se movimentaram por quase toda a sua superfície no início e posteriormente se concentraram em um único ponto.

❖ **Fase de Construção (\bar{C}):** as células auxiliares, observadas desde a Fase Inicial, apresentaram duração total da construção variando de 51,14 a 356,05 min (Tab. 5) e sem diferença entre as colônias ($F= 0,15$; $p= 0,92$; Tukey HSD: $p > 0,50$; $n= 4$ colônias). O número de operárias no início da construção variou de 0-5 enquanto que na fase final foi de 2-5 ($n= 10$ ACAs).

- **Subfase de Formação da Concavidade (\overline{Cov}):** caracterizada pela atividade de operárias em uma região específica da célula, onde a cera foi cuidadosamente manipulada de modo a formar uma concavidade que serviu como suporte para a célula auxiliar. Desta forma as duas células possuíram uma parede em comum e, assim, a célula auxiliar não possuiu fundo próprio. A formação da leve depressão resultou em um afinamento desta parede evidenciada pela aparência mais transparente da cera ou diferença de coloração. O grau de excitação e o número de operárias envolvidas nesta fase variaram.

- **Subfase de Elevação de Paredes (\overline{Cep})** após a formação da concavidade sobre a célula existente, as operárias iniciaram o soerguimento das paredes da célula auxiliar. De modo semelhante ao POP, o número de operárias nesta fase foi proporcional ao aumento do nível da construção, sendo a parte final caracterizada por substituições cada vez mais rápidas de operárias. No início, de 0 a 5 operárias foram observadas na célula em construção, enquanto que na fase final sempre houve no mínimo duas operárias.

- ❖ **Fase de Descarga de Alimento (\overline{Da})**

- **Subfase de Descarga de Alimento (\overline{da}):** tempo da primeira a última descarga em uma célula, sendo consideradas todas as inserções de operárias após a primeira regurgitação. As colônias não diferiram entre si na duração desta fase que variou de 59,53 a 861,4 segundos ($F= 1,73$; $p= 0,25$; Tukey HSD: $p > 0,50$; $R^2_{adj} = 0,18$; $n= 4$ colônias) (Tab. 5). O número de inserções na célula variou de 18 a 116 ($32,82 \pm 27,88$).

- **Subfase de Transição (\overline{dt}):** fase na qual foi possível verificar um conflito entre as operárias sobre a célula auxiliar. Enquanto algumas iniciaram a operculação, outras estavam excitadamente puxando a cera, desoperculando a célula e/ou se inserindo nela. Na maioria dos casos as operárias atuando na desoperculação vibraram seu corpo enquanto se inseriam na célula.

- ❖ **Fase de Oviposição (\overline{Oo}):** fase em que houve oviposição por operária. A frequência desta fase nas células auxiliares foi baixa (27,27%; $n= 11$). Os três casos registrados envolveram postura por apenas uma operária e sua duração variou de 14,8 a 53,54 segundos. Após a oviposição, outras operárias inseriram a região anterior do corpo na célula e realizaram antenação com o ovo sem realizar oofagia. Em um dos casos na colônia III (em 15/09/14; célula 9, Tab. 5), a operária ovipositou, mas o ovo permaneceu aderido ao seu abdome. Ela andou com o ovo por 20 segundos sem que este se desprendesse, sendo posteriormente retirado pela própria operária.

- ❖ **Fase de Operculação (\overline{Op}):** fechamento da célula. Pode incluir duas subfases:
 - **Subfase de Pré-operculação (\overline{Opp}):** intervalo entre a fase de provisionamento ou de oviposição e primeira manipulação da cera para fechamento da célula. Esta subfase ocorreu apenas uma vez (19,64 s).
 - **Subfase de Operculação Principal (\overline{op}):** período desde as primeiras manipulações de cera até o fechamento do orifício da célula. Esta subfase, geralmente, se iniciou quando outras operárias colocavam ovos ou se inseriam na célula auxiliar e, nestes casos, incluiu as fases de transição (\overline{dt}) e de oviposição (\overline{Oo}). Estas atividades antagônicas realizadas ao mesmo tempo na célula prolongaram a subfase de operculação. A duração desta fase nos ACAs observados variou de 2,5 a 15,11 minutos (Tab. 5). As colônias não diferiram na duração desta fase ($F= 3,8$; $p= 0,07$; $n= 4$ colônias), com exceção às colônias I e II que diferiram entre si (Tukey HSD: $p= 0,047$). Normalmente uma operária iniciou a operculação e até sete foram vistas no decorrer do processo. A operculação da célula auxiliar e no POP em *P. lucii* não foi por rotação, mas por manipulações da cera por várias operárias trabalhando lado a lado.

As siglas dos eventos de POP e ACA utilizadas neste trabalho estão explicadas resumidamente na Tabela 6.

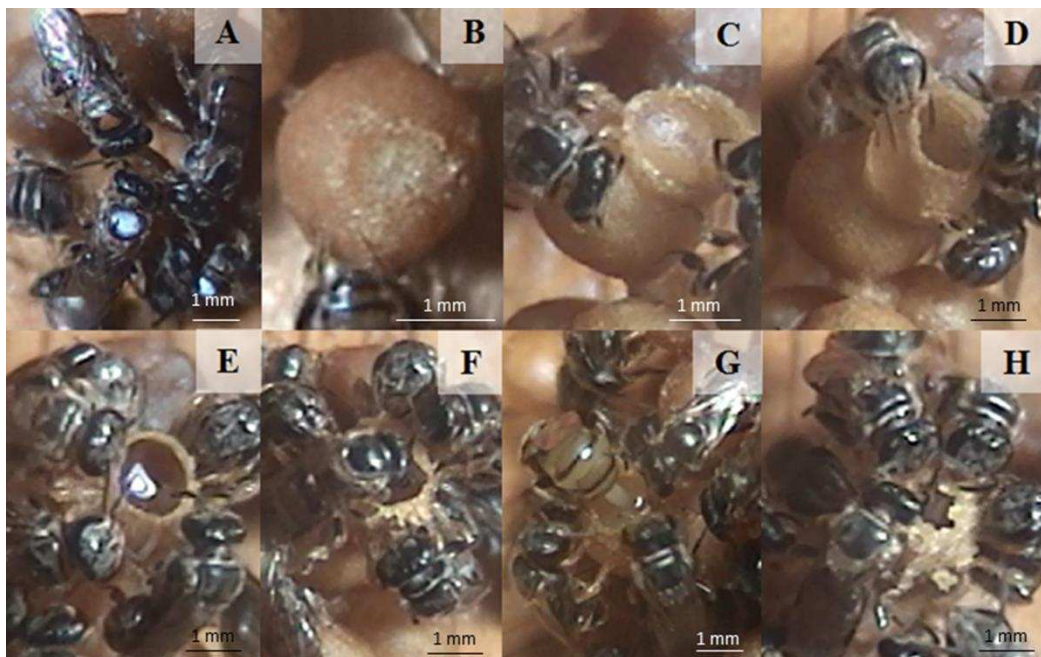


Figura 6 – Construção de célula auxiliar em colônias órfãs de *Plebeia lucii*. (A): Fase de aglomeração (\overline{Ag}); Fase de construção (\overline{C}) → (B): subfase de formação de concavidade (\overline{Cov}) e (C e D): subfase de elevação de paredes (\overline{Cep}); Fase de provisionamento (\overline{Da}) → (E): subfase de descarga de alimento (\overline{da}) e (F): subfase de transição (\overline{dt}); (G): Fase de oviposição (\overline{Oo}); (H): Subfase de operculação principal (\overline{op}).

Tabela 5 – Dados quantitativos dos eventos de Adição de Célula Auxiliar (ACA) registrados em colônias órfãs de *Plebeia lucii*. (\bar{C}): Fase de construção; (\bar{D}_a): provisão; (\bar{O}_o): oviposição de operárias na célula auxiliar; (\bar{op}): operulação principal.

Colônia	Data	Célula	Hora de início da observação	Nível de construção	\bar{C} (min)	\bar{D}_a (seg)	Nº de inserções em \bar{D}_a	\bar{O}_o (seg)	Nº de operárias que \bar{O}_o	\bar{op} (min)	ACA Total (min)
I	31/03/15	1	9h25min	1/3	128,44	861,4	116	0	0	15,11	18,92
	06/04/15	2	15h55min	2/3	81,56	111,43	28	14,8	1	4,8	7,24
II	17/03/15	3	17h02min	1/3	124,1	59,53	21	0	0	2,25	3,59
	25/03/15	4	8h50min	1/3	85,62	92,9	18	0	0	2,99	4,02
	27/03/15	5	14h45min	1/3	66,28	132,24	23	0	0	2,93	4,04
	14/05/15	6	16h58min	1/3	81,87	120	21	0	0	3,63	4,08
III	19/03/15	7	17h05min	1/3	51,14	103,76	22	0	0	3,24	3,83
	08/05/15	8	18h20min	1/3	63,08	143	31	0	0	5,47	6,57
	15/09/14	9	12h56min	1/3	53,6	134,5	28	53,54	1	5,32	7,44
	24/09/14	10	15h20min	1/3	356,05	135,73	24	26,36	1	4,51	5,92
VI	22/05/15	11	18h30min	1/3	123,97	171	29	0	0	4,25	6,2
Valores mínimo e máximo					51,14 - 356,05	59,53 - 861,4	18 - 116	14,8 - 53,54	0 - 1	2,25 - 15,11	3,59 - 18,92
Média					113,42	187,77	32,82	31,57	0,27	4,95	6,53
Desvio padrão					90,25	225,3	27,88	19,89	0,47	3,52	4,36
n					10	11		3	11	11	11
Variância					8144,67	50761,65	777,36	395,53	0,22	12,42	18,98
Erro Padrão					28,54	67,93	8,41	11,48	0,14	1,06	1,31

Tabela 6 – Lista das siglas utilizadas neste estudo e suas definições.

Processos de construção de células de cria
<p>POP → Processo de Aproveitamento e Postura (<i>Provisioning and Oviposition Process</i>) (SAKAGAMI et al.1965);</p> <p>ACA → Processo de Adição de Célula Auxiliar (<i>Auxiliary Cell Addition</i>);</p> <p>POPw → Processo de Aproveitamento e Postura por Operárias em Colônias Órfãs (<i>Provisioning and Oviposition Process by Workers</i>).</p>
<p>IOP → Processo de Oviposição Integrada (<i>Integrated Oviposition Process</i>);</p> <p>UOP → Processo de Oviposição Único (<i>Unit Oviposition Process</i>).</p> <p>(SAKAGAMI & ZUCCHI 1974)</p>
<p>C → Rainha anda pelo favo (<i>cruising on the comb</i>);</p> <p>W → Rainha espera em uma célula particular (<i>waiting</i>);</p> <p>E → Inspeção da célula pela rainha;</p> <p>L → Agitação localizada a uma célula ou região do favo;</p> <p>G → Agitação generalizada por todo o favo.</p> <p>(SAKAGAMI & ZUCCHI 1974)</p>
Tipos de construção de células de cria
<p>C_c → <u>Construção Sucessiva</u>: células em diferentes estágios de crescimento podem ser comumente encontradas em um dado momento;</p> <p>C_y → <u>Construção Sincrônica</u>: células em mesmo estágio de crescimento são comumente encontradas em um dado momento;</p> <p>C_m → <u>Construção Semissincrônica</u>: inicia-se de modo sucessivo, mas as diferenças se tornam gradualmente menores com o passar do tempo.</p> <p>(SAKAGAMI & ZUCCHI 1974; DRUMOND et al. 1997)</p>
Padrão de postura da rainha
<p>B_e → <u>Exclusivamente Agrupado</u>: mais de uma célula recebe postura por POP. Nestes casos a oviposição é integrada (IOP). O número de células e o tempo entre dois IOPs são grandes e estáveis;</p> <p>B_f → <u>Facultativamente Agrupado</u>: mais de uma célula recebe postura por IOP. O número de células e o tempo entre dois IOPs são variáveis;</p> <p>B_s → <u>Predominantemente Singular</u>: somente uma célula recebe postura e, neste caso, a oviposição é única (UOP).</p> <p>(SAKAGAMI & ZUCCHI 1974)</p>
Processo de Aproveitamento e Postura (POP)
<p>A → <u>Período de Extraoviposição</u></p> <p>\bar{Q} → <u>Fase Quiescente</u>: fase livre de excitação com início ao final de um processo de postura e término quando se iniciam os primórdios para o próximo.</p>

\bar{T} → Fase de Transição: período entre \bar{Q} e \bar{P} .

B → Período de Oviposição

\bar{P} → Fase de Patrulhamento ou Prefixação: caracterizada pelo aumento na frequência das visitas da rainha às células em construção e do seu tempo de permanência na cria e pela presença de células em colar com aglomerado de operárias ao redor.

\bar{A} → Fase de Excitação: período desde a chegada definitiva da rainha no favo até o início do primeiro UOP. Consiste na alternância entre andar pelo favo (C) e ficar esperando (W) em uma célula em particular com ou sem inspeção da célula (E).

\bar{p}_r → Fase de Espera Pré-descarga: inicia com a parada (fixação) da rainha em uma célula em colar e termina com a primeira descarga de alimento. Nesta fase a agitação pode ser localizada (L) ou generalizada por todo o favo (G).

\bar{P} → Fase de Descarga: fase na qual as operárias depositam o alimento na célula. Pode ocorrer de quatro formas e contém duas subfases:

P_c → Descarga Sucessiva: a descarga em uma célula ocorre sempre após a oviposição na célula anterior;

P_y → Descarga Sincrônica: a descarga em uma célula ocorre após a descarga na célula anterior;

P_m → Descarga Semissincrônica: primeiro como em P_c depois como em P_y ;

D_0 → Descarga Singular: ocorre em oviposições singulares.

\bar{p} → Subfase de Descarga: tempo do início da primeira descarga até o fim da última em uma célula;

\bar{p}_s → Subfase de Pós-descarga: do último provisionamento ao início da fase de oviposição.

\bar{o} → Fase de Oviposição

\bar{o}_i → Subfase de Inspeção: duração da inspeção/ingestão de alimento pela rainha.

\bar{o}_p → Subfase de Postura: duração da postura pela rainha dentro da célula.

\bar{s} → Fase de Operculação: fechamento da célula.

\bar{s}_p → Subfase de Pré-operculação: do fim de \bar{o} até o início da rotação;

\bar{s}_r → Subfase de Rotação Principal;

\bar{s}_t → Subfase de Transição;

\bar{s}_s → Subfase de “Sidework”: manipulações da cera após a abertura da célula ser totalmente fechada;

\bar{s}_o → Subfase de Operculação Principal: da primeira manipulação da cera até o visível fechamento do orifício da célula.

(SAKAGAMI & ZUCCHI 1974; DRUMOND et al. 1997; Com exceção às adaptações realizadas no presente estudo conforme disposto na Seção 2.2.1.1)

Processo de Adição de Célula Auxiliar (ACA)

\bar{A}_g → Fase de Aglomeração de Operárias: primeiras atividades na célula a receber a célula auxiliar marcadas por um aglomerado de operárias com alto grau de excitação.

\bar{C} → Fase de Construção

\bar{Cov} → Subfase de Formação da Concavidade: manipulação da cera e formação de concavidade que serve como suporte para a célula auxiliar;

\bar{Cep} → Subfase de Elevação de Paredes: soerguimento das paredes da célula auxiliar.

\bar{Da} → Fase de Descarga de Alimento

\bar{da} → Subfase de Descarga de Alimento: tempo da primeira a última descarga em uma célula, sendo consideradas todas as inserções de operárias após a primeira regurgitação.

\bar{dt} → Subfase de Transição: sobreposição de atividades de inserção, operculação e oviposição.

\bar{Oo} → Fase de Oviposição: fase de oviposição por operária.

\bar{Op} → Fase de Operculação

\bar{Opp} → Subfase de Pré-operculação: intervalo entre o fim da descarga de alimento ou da oviposição e as primeiras manipulações na cera para fechamento da célula;

\bar{op} → Subfase de Operculação Principal: período desde as primeiras manipulações de cera até o visível fechamento do orifício da célula.

3.2.1.2 Raios-X de células auxiliares

Nas imagens obtidas por raios-X foi possível determinar as regiões anterior e posterior das larvas e definir a posição das células auxiliares em relação a essas regiões (Fig. 7A). Na célula com duas células auxiliares na colônia II a larva perfurou e se alimentou do conteúdo de apenas uma das células. Não foi possível obter a rainha desta larva, pois a célula foi aberta pelas operárias impedindo seu desenvolvimento (Fig. 7B). Fotoradiogramas de células registrados após intervalo de três minutos mostraram mudanças nas posições das larvas (Fig. 7C e 7D).

A adição da célula auxiliar ocorreu quando não havia mais alimento disponível na célula larval (Fig. 7E e 7F). Em um dos casos, uma célula auxiliar adicionada na colônia II foi desfeita pelas operárias 12 dias após aparente defecação da larva. A célula foi colocada em placa de Petri e dela emergiu uma rainha.

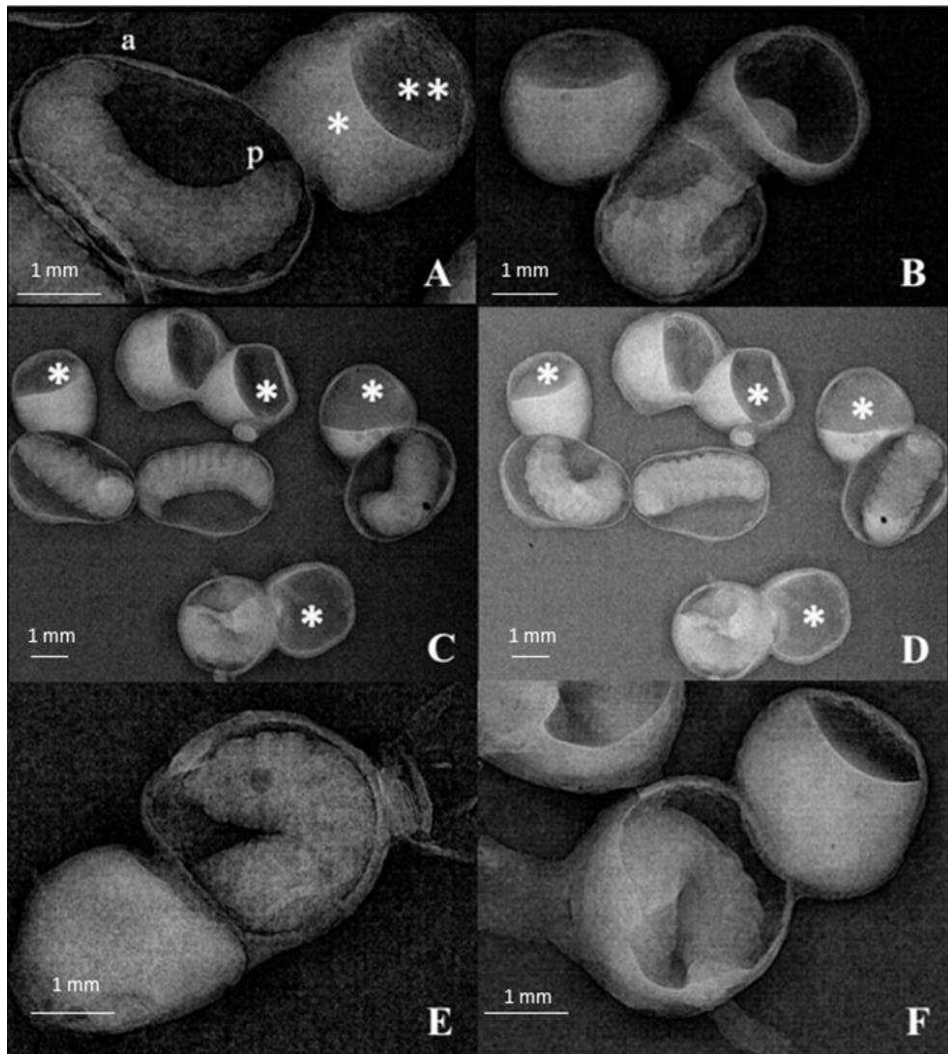


Figura 7 – Raios-X de células de cria com adição de célula auxiliar em colônias órfãs de *Plebeia lucii*. (A): Identificação das regiões anterior (a) e posterior (p) da larva. (B): Imagem de uma célula de cria com duas células auxiliares mostrando que a larva perfurou apenas uma delas. (C e D): Imagens capturadas em intervalo de três minutos mostrando movimentação significativa das larvas dentro da célula. (E e F): Imagens obtidas imediatamente após a adição mostram célula larval sem alimento disponível. (*): células auxiliares; (**): câmara de ar.

Três larvas não perfuraram as células auxiliares adicionadas e em todas estas havia postura de operárias e duas das larvas eram pós-defecantes (Fig. 8). Das três, apenas uma delas estava com a região anterior posicionada próxima à célula auxiliar. Não foram obtidos os indivíduos adultos destas células uma vez que operárias as abriram e expuseram as larvas, o que impediu seus desenvolvimentos.

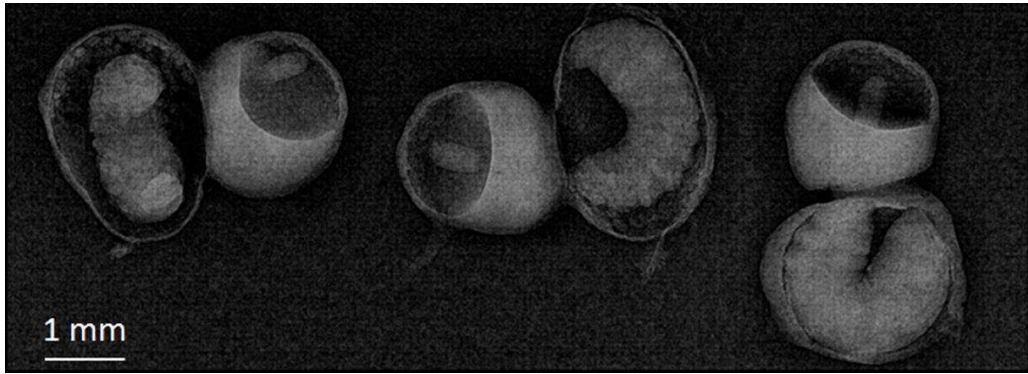


Figura 8 – Células de *Plebeia lucii* com célula auxiliar adicionada há dias sem aparente perfuração pela larva. As duas primeiras larvas da esquerda já haviam defecado.

As células com postura de operárias que receberam célula auxiliar mostraram larvas após a fase de alimentação ou pupas sem ter perfurado a parede entre as células (Fig. 9).

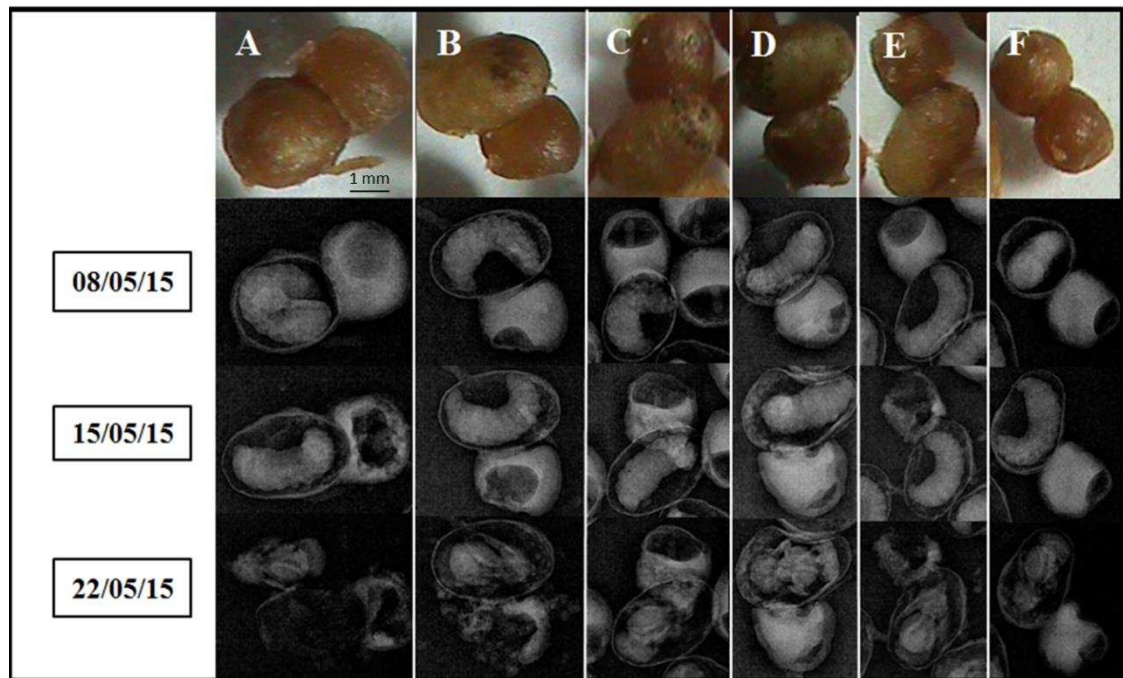


Figura 9 – Fotorradiogramas de células com postura de operárias de *Plebeia lucii* que receberam célula auxiliar mostram não perfuração pela larva. Em (A) no dia 22/05 a célula foi aberta pelas operárias e a pupa colocada para fora da célula. Em (B) dia 22/05 e em (E) dia 15/05 as células auxiliares estavam abertas e esvaziadas pelas operárias.

Movimentação larval foi detectada em imagens capturadas em intervalo de três minutos (Figuras 9C e 9D) e semanalmente (Figura 7C e 7D). Larvas mudaram a posição dorsoventral em até 360° (Figuras 9A e 9D), mas apresentaram pouca movimentação anteroposterior. A larva mudou a cabeça de lugar em limitada amplitude

por contrações e relaxamentos. A cabeça nunca foi vista onde antes o ânus estava posicionado.

3.2.2 Produção de células para aprovisionamento e postura por operárias em colônias órfãs (POPw)

Três das colônias de *P. lucii* observadas (I, II e III) apresentaram POPw $26,33 \pm 3,51$ dias (23 – 30 dias) após o início da condição órfã. Estas foram caracterizadas por uma cera visualmente mais grossa e escura e algumas foram construídas muito próximas umas das outras se assemelhando a células auxiliares, sendo alguns casos considerados como tais, conforme exposto na Seção 3.2.1 (Fig. 10).

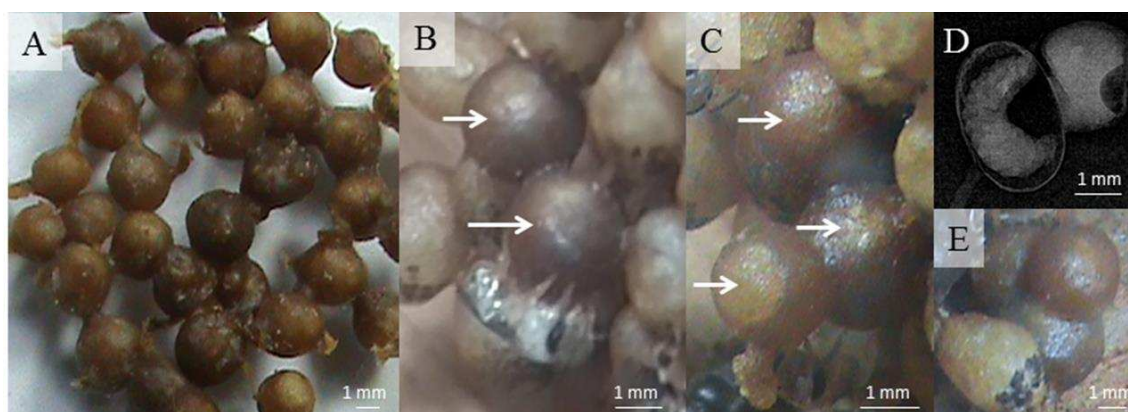


Figura 10 – Células para aprovisionamento e postura por operárias em colônias órfãs (POPw) de *Plebeia lucii*. (A): Aspectos gerais de células com cera mais grossa e escura. Células construídas muito próximas umas às outras chegando a visualmente se assemelhar à adição de célula auxiliar. (B) - (C): Célula construída de modo muito próximo à outra. (D): Raios-X de célula com célula auxiliar. (E): Células construídas muito próximas. As setas destacam as células com larva originada de ovo posto por operária.

Os primeiros POPws registrados nas colônias I e III ocorreram até 30 dias após a retirada da rainha e apresentaram comportamentos em comum entre si e muito diferenciados em relação aos POPws dos dias subsequentes. Estes foram caracterizados por construções singulares, uma vez que uma nova célula só começou a ser construída quando a anterior já havia sido operculada, além de outras peculiaridades detalhadamente descritas nos parágrafos a seguir.

O primeiro registro de POPW na colônia III foi realizado após 26 dias de orfandade. Outras oito células ao redor indicaram que a atividade de POPW já havia começado há poucos dias. Este primeiro registro foi notadamente diferente dos demais.

Não houve exhibições de excitação exacerbada na finalização da fase construção. Uma operária, após a célula estar completamente provisionada, se posicionou sobre ela impedindo que outras fizessem o mesmo. Esta chegou a rapidamente colocar o seu abdome sobre a célula como que iniciando oviposição, mas não a realizou. Após certo tempo de exibição deste comportamento, que durou 3 min e 47 seg, sem ocorrência de oviposição, a célula começou a ser esvaziada. Houve cerca de 70 inserções responsáveis tanto pelo provisionamento como pelo esvaziamento da célula. Meia hora depois do esvaziamento atividades esporádicas de operárias manipulando o interior e bordas da célula puderam ser vistas.

O primeiro registro de POPw na colônia I foi realizado 23 dias após a retirada da rainha e também foi caracterizado por esvaziamento de célula após regurgitação sem realização de postura. No entanto, nos casos de ambas as colônias, é provável que o POPw tenha sido retomado posteriormente e as células recebido postura, uma vez que estas foram visualizadas fechadas no dia seguinte.

O segundo caso na colônia III foi filmado 30 dias após a retirada da rainha. Neste, a excitação e substituição de operárias na fase final da construção foi mais acentuada em relação à primeira célula filmada. Após quatro operárias esvaziarem totalmente seu papo na célula, uma quinta operária se inseriu e permaneceu sobre a mesma por 26 segundos impedindo que outras também o fizessem. Logo em seguida a mesma operária inseriu seu abdome na célula e realizou postura. Esta foi a única postura realizada e houve nítida reação deterrente à operculação e aproximação pelas operárias que resultou em 15 segundos de pré-operculação (Célula 7; Tab. 7).

Os segundo e terceiro registros na colônia I, e que foram realizados após 24 e 25 dias de condição órfã, foram caracterizados por comportamentos semelhantes de postura única ou esvaziamento de célula.

Os POPws registrados após 30 dias de condição órfã em todas as colônias diferiram dos eventos supracitados por apresentarem: 1- construções simultâneas de células; 2- maior nível de excitação de operárias ao final da construção e após o início da regurgitação, 3- operárias que se inseriram na célula após a primeira postura e tocaram o ovo com antena e tarsos anteriores o que, em alguns casos, resultou na queda

deste sobre a superfície do alimento; 4- mais de uma oviposição por célula que ocorreu por posturas consecutivas ou pela reabertura de células recém operculadas.

Oviposições só foram realizadas dentro de células prontas e com alimento. Dois tipos de ovos de operárias foram colocados: um afilado e transparente e outro semelhante a uma gota gelatinosa esbranquiçada, denominados, respectivamente, de funcional e trófico. Casos de oofagia só foram observados quando um ovo acidentalmente era deixado fora da célula (casos de ovos que permaneceram aderidos ao abdome após postura) e quando o ovo colocado dentro da célula era trófico, o qual era rapidamente ingerido por uma única operária próxima (Fig. 11). As operárias posicionaram seus abdômes dentro da célula para colocar ambos os tipos de ovos.



Figura 11 – Postura por operárias em células de macho em colônias de *Plebeia lucii*. (A) Ovo funcional colocado dentro de célula de macho. (B) Ovo trófico. (C) Operária ingerindo ovo trófico que ficou aderido à borda externa da célula.

Durante algumas posturas operárias se utilizaram das pernas posteriores ou mesmo do bordo da célula para desprender o ovo do abdome e deixa-lo dentro da célula. Ovos tróficos ficaram mais frequentemente presos nas bordas externas da parede da célula.

A taxa de postura de ovos tróficos foi baixa (9%; n= 22 ovos) e ocorreu apenas na colônia I em uma única célula. O tempo de postura destes foi semelhante ao tempo de postura de outros funcionais (Tab. 7).

Houve um caso de esvaziamento de célula na colônia III quando está já estava órfã há 63 dias e havia realizado POPws com múltiplas posturas. Próximo a esta célula, na parede da colônia, havia uma rainha virgem recém-emergida em descanso com corte formada. Apesar das operárias terem regurgitado sob uma atmosfera agitada, após cerca de 100 inserções rápidas, a célula foi completamente esvaziada.

Nos casos em que houve tentativa ou efetiva realização de mais de uma postura, foi possível observar uma fase de conflito entre as operárias sobre a célula de macho semelhante ao observado na fase de transição para adição de célula auxiliar. Após a primeira postura, enquanto algumas operárias iniciaram a operculação, outras estavam excitadamente sobre a célula com nítidas vibrações de corpo e movimentos de reabertura de regiões cujo fechamento já havia sido iniciado. Tal conflito terminou após postura por operária desoperculadora ou mesmo desistência desta após certo tempo.

Os casos de múltiplas oviposições através de reaberturas de células foram caracterizados por uma operária excitadamente realizando remoções de cera de uma célula recém operculada e ainda contendo operárias trabalhando sobre a sua superfície. Caracteristicamente apresentando excitação e tremor de corpo, a operária a desopercular foi geralmente seguida por até outras três operárias, sendo em poucos segundos estabelecida nova atmosfera de agitação em torno da célula composta por inúmeras operárias. Enquanto algumas abriam, outras continuavam a opercular. Após uma ou várias oviposições, a célula foi novamente fechada. Em alguns casos, a reabertura chegou a acontecer mais de uma vez por célula. Desta forma, a fase de conflito se repetiu inúmeras vezes em uma mesma célula, não sendo limitada pela operculação (Figura 12).

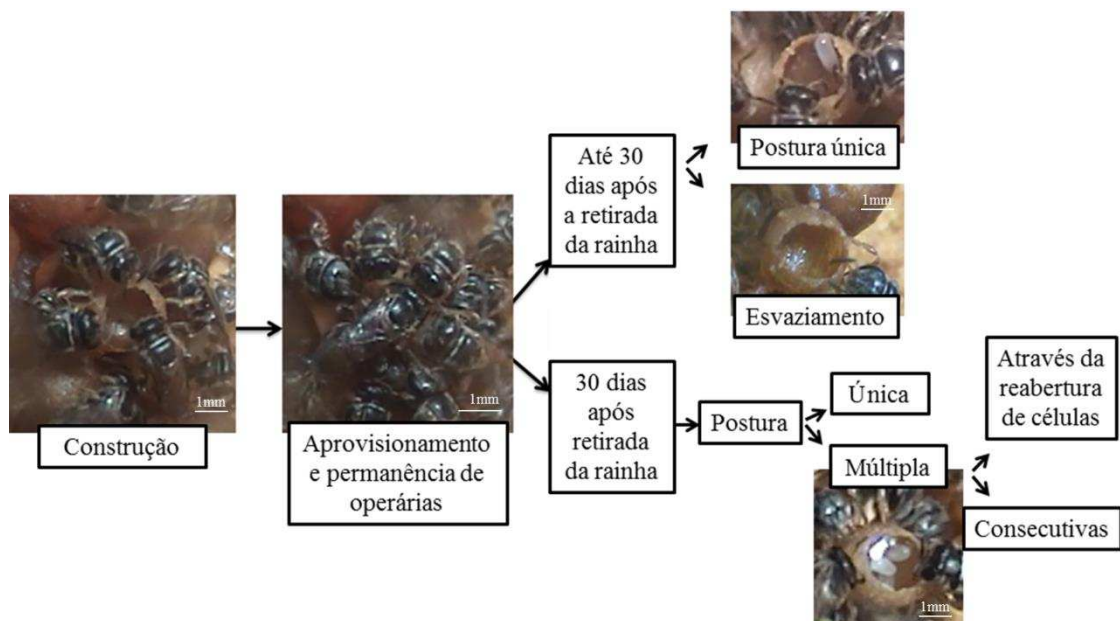


Figura 12 – Padrão geral do processo de produção de células para aprovisionamento e postura por operárias em colônias órfãs (POPw) de *Plebeia lucii*.

Tabela 7 – Dados quantitativos dos eventos do Processo de Aprovisionamento e Postura por operárias em colônias órfãs (POPw) registrados em colônias órfãs de *Plebeia lucii*. \bar{P}_{POPw} : aprovisionamento; \bar{o}_{POPw} : oviposição de operárias; \bar{s}_{POPw} : operculação (\bar{s}_{p-POPw} : pré-operculação; \bar{s}_{o-POPw} : operculação principal). (*): houve apenas registros relacionados à oviposição, pois se tratou de um caso de reabertura de célula recém-operculada. (**): não foram calculados, uma vez que apenas um caso foi registrado desde a fase inicial da construção.

Colônia	Data (2015)	Célula	\bar{P}_{POPw} (seg)	Nº de operárias \bar{P}_{POPw}	\bar{o}_{POPw} (seg)			Nº de operárias \bar{o}_{POPw}	\bar{s}_{POPw}		POPw total (min)	
									\bar{s}_{p-POPw} (seg)	\bar{s}_{o-POPw} (min)		
I	17/03	1	542	56	28			1	0	12,82	13,97	
	30/03	2	50	15	39	16	15	17	4	11	16,13	17,8
	27/04	3	114	10	48		17		2	46	18,92	22,48
	07/05	4*	-	-	155	13	29		3	-	-	-
	14/05	5	29	10	20		15		2	21	7,12	8,28
	18/05	6	443	137	15			1	17	3,63	11,58	
III	17/04	7	46	4	14			1	15	5,48	6,75	
	20/04	8	71	15	16			1	4	14,23	6,75	
	23/04	9	38	9	22,43			1	9,7	4,81	5,98	
	27/04	10	118,6	24	20	20	16		3	29,9	6,23	9,07
V	20/05	11	50	16	06	18	12		3	16	8,85	10,08
Valores mínimo e máximo			29 - 542	4 - 137	06 - 155			0 - 4	0 - 46	3,63 - 18,92	5,9 - 22,48	
Média ± Desvio padrão			150,16 ± 184,4	38,83 ± 42,94	25,97 ± 30,26			1,47 ± 1,3	16,96 ± 13,23	9,82 ± 5,32	10,78 ± 5,35	
n			10	12	22			15	10	10	11	
Variância			34004,08	1844,33	915,51			1,7	175,08	28,27	28,6	
Erro Padrão			58,31	12,4	6,45			0,34	4,18	1,68	1,61	

3.3 POP e ACA

O tempo gasto nas construções de células encontradas construídas até 1/3, não diferiu entre os comportamentos de POP e ACA ($p= 0,52$; $F= 0,44$; Tukey HSD: $p= 0,50$; POP: $n= 8$; ACA: $n= 10$) e não foi influenciada pela colônia ($p= 0,38$; $F= 1,137$; Tukey HSD: $p > 0,05$; $n= 4$) (Fig. 13A).

Uma vez que no POP a fase de pré-aprovisionamento foi marcada pela chegada e fixação da rainha na célula para postura, não foi possível demarcar a possível existência desta fase no ACA em colônias órfãs. Ao contrário do observado no POP, o estímulo para a primeira regurgitação de operárias na célula auxiliar não foi evidente. Ela pode ocorrer em meio à alta agitação ou não, minutos após a célula aparentemente estar pronta ou ser imediata. Os dados coletados para esta fase foram similares entre colônias ($F= 1,84$; $p= 0,23$; $n= 4$ colônias).

A duração da fase regurgitação (POP= $13,63 \pm 4,92$ s; ACA= $187,77 \pm 225,3$ s) não foi afetada pelo fator Colônia ($p= 0,09$; $F= 2,672$; Teste Tukey HSD: $p > 0,05$; $n= 4$ colônias), mas diferiu entre os dois comportamentos ($p < 0,001$; $F= 116,633$; Teste Tukey HSD: $p= 0,000151$; $n= 11$), uma vez que na célula auxiliar foi maior do que durante o POP (Fig. 13B).

A duração da oviposição foi diferente entre rainhas ($13,96 \pm 2,69$ s; $n= 11$) e operárias ($31,52 \pm 19,89$ s; $n= 3$) ($p= 0,0055$; $F= 11,416$; Teste Tukey HSD: $p= 0,0056$).

A fase de operculação principal apresentou diferenças entre colônias ($p= 0,0495$; $F= 3,355$), mas não entre os diferentes comportamentos (POP: $4,3 \pm 0,97$ min; $n= 11$; ACA: $4,95 \pm 3,52$ min; $n= 11$; $p= 0,64$; $F= 0,22$; Teste Tukey HSD: $p= 0,87$; $n= 11$).

As durações totais do POP e ACA foram semelhantes ($p= 0,47$; $F= 0,553$; Teste Tukey HSD: $p= 0,94$), mas diferiram entre colônias ($F= 3,45$; $p= 0,046$; Teste Tukey HSD: $p > 0,05$).

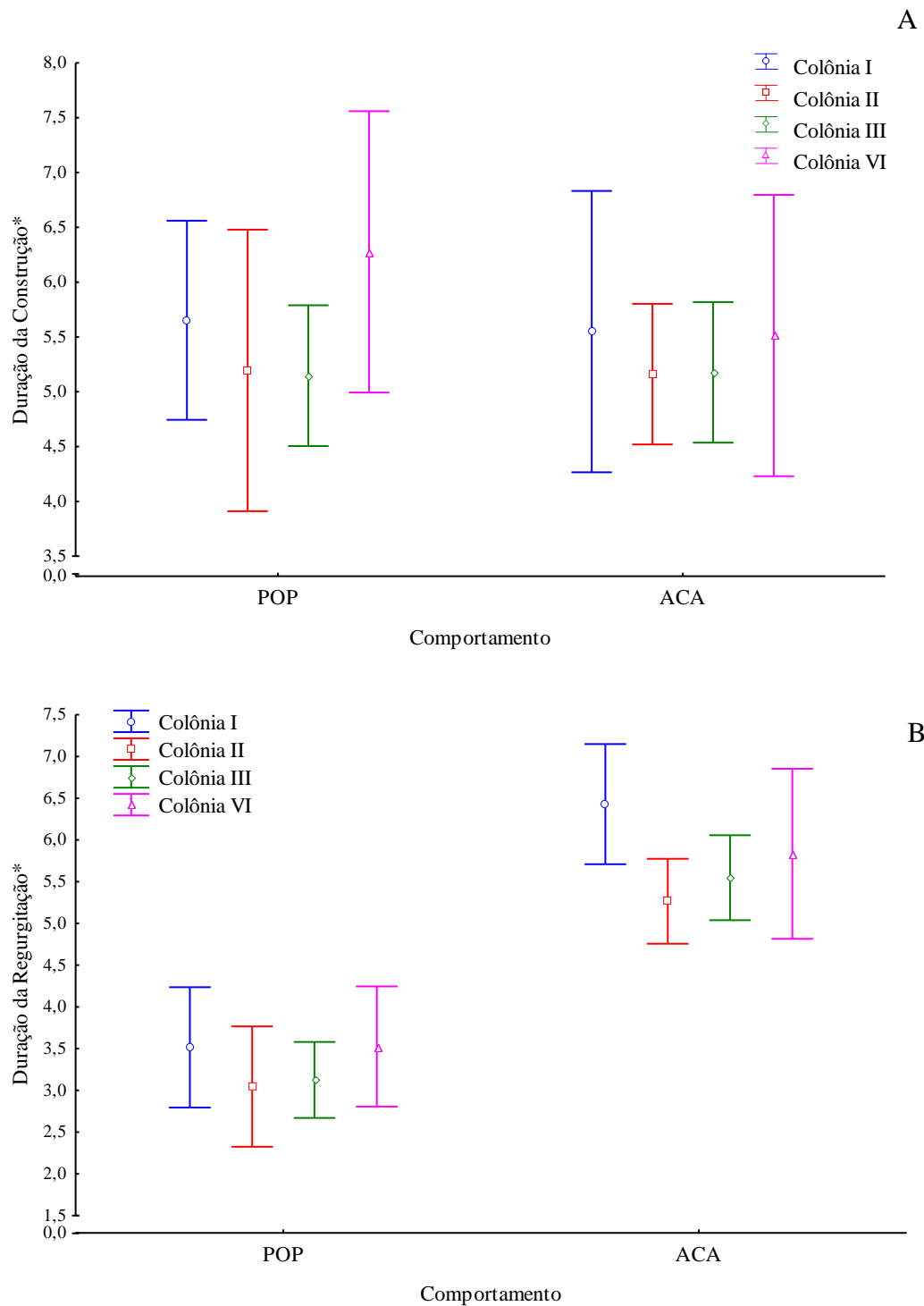


Figura 13 – Teste ANOVA da duração da Fase de Construção (A) ($F= 0,258$; $p= 0,85$) e da Fase de Regurgitação (B) ($F= 0,44$; $p= 0,725$) em células dos processos de adição de célula auxiliar (ACA) e de aprovisionamento e postura (POP) em quatro colônias de *Plebeia lucii*. (*): Dados apresentados nas Tabelas 5 e 6 após transformação ($x \rightarrow \arcsen(x)$). Nas barras estão representados o erro padrão e a média amostral em cada colônia.

4. DISCUSSÃO

4.1. COLÔNIA COM RAINHA

A presença de células auxiliares em colônias de *P. lucii* com rainha e ausência de construção de realeiras durante os POPs registrados corroboram com estudo anterior de que este é o modo natural de produção de rainhas na espécie (TEIXEIRA 2007; 2011). Esta ausência de realeiras típicas e produção de rainhas apenas através de célula auxiliar também ocorre em *F. silvestrii*, enquanto que em *T. carbonaria* ela aparece apenas em condição órfã e após alteração da disposição dos favos de cria (FAUSTINO et al. 2002; TEIXEIRA 2012; NUNES et al. 2015).

A não detecção da construção em andamento pode ser explicada pela ocorrência reduzida e ocasional de produção de realeiras típicas das espécies com produção trófica (HARTFELDER et al. 2006). Além disto, elas podem preferencialmente, ter ocorrido em locais com cria sobreposta.

As taxas de ocorrência diária e a duração das fases do POP podem variar entre colônias da mesma espécie conforme condições internas da colônia e estoque de alimento (PEREIRA et al. 2009). As colônias de *P. lucii* utilizadas neste estudo foram analisadas em curto espaço de tempo (fevereiro a maio) de modo a evitar influências sazonais e as colônias foram semelhantes quanto à quantidade de alimento estocado. Desta forma, os dados quantitativos e qualitativos de POPs aqui obtidos podem diferir de outros registrados em períodos diferentes do ano ou em colônias com condições internas diferentes das apresentadas pelas colônias deste estudo.

4.1.1. Comportamentos não envolvidos no POP

O comportamento de descanso da rainha de *P. lucii* predominantemente sobre as células de cria se assemelha ao observado em *Nannotrigona* Cockerell, *Geotrigona* Moure (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974), *Plebeia julianii* Moure, *P. remota* e *Plebeia emerina* Friese (DRUMOND et al. 1996b; 1998) cujas rainhas podem permanecer paradas ou caminhando sobre o favo de cria na maior parte das observações no período de extraoviposição. Isto difere de *F. schrottkyi*, *P. droryana* e *Plebeia poecilochroa* Moure & Camargo nas quais a rainha é raramente vista sobre o favo, exceto por visitas rápidas (SAKAGAMI et al. 1973; DRUMOND et al. 1996a; 1997). No entanto, em

todas estas espécies, ao contrário do observado em *L. muelleri* e *Tetragonisca* Moure (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974; SAKAGAMI et al. 1973), as rainhas não possuem um lugar definido de descanso.

A locomoção da rainha de *P. lucii* no período extraoviposição não é como em *P. droryana* e *P. poecilochroa* caracterizada por ser abrupta e com remarcada velocidade e sacudidas de corpo irregulares (DRUMOND et al. 1996a; 1997). A locomoção lenta e sem as mudanças rápidas de direção são semelhantes às observadas em *P. remota* e *P. emerina* (DRUMOND et al. 1996b). O máximo de contato entre rainha e operárias de *P. lucii* é o antenal e com as pernas anteriores, diferente de *P. droryana* na qual há avanços da rainha em direção às operárias com movimentos abruptos ou agressividade e caracterizados pelo comportamento de manter a operária pressionada ou presa pelas mandíbulas (DRUMOND et al. 1996a).

A reação de operárias de *P. lucii* à aproximação da rainha, caracterizada apenas por afastamento ou fuga, difere do observado em *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, *Trigonisca duckei* Friese, *P. poecilochroa*, *P. julianii*, *P. droryana*, *P. remota* e *P. emerina* (DRUMOND et al. 1996a; b; 1997; 1998; SAKAGAMI et al. 1993). Nestas espécies, ocorrem comportamentos hipnóticos caracterizados por minuciosos movimentos sequenciais ritualizados realizados por operárias.

Plebeia apresenta comportamentos hipnóticos em algum grau em todas as suas espécies até aqui estudadas, sendo que *P. droryana* apresenta sequência comportamental completa e frequentemente expressa (DRUMOND et al. 1996a). Neste contexto, eram esperados ao menos resquícios de algum destes comportamentos hipnóticos em *P. lucii*, o que não foi encontrado. Nisto *L. muelleri*, outra espécie com cria disposta em cacho, e *F. schrottkyi*, espécie com células de cria em formato de disco ou irregular, se assemelham a *P. lucii* uma vez que não apresenta qualquer comportamento ritualizado de resposta por operárias à aproximação da rainha (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974; SAKAGAMI et al. 1973).

4.1.2. Construção de células

A construção Sucessiva (C_c) de células e o padrão de postura Predominantemente Singular (B_s) em *P. lucii* diferem de *N. testaceicornis*, *L. muelleri*, *T. duckei*, *P. droryana*, *P. emerina*, *P. remota*, *P. poecilochroa* e *P. julianii* que possuem construção Sincrônica (C_y) ou Semissincrônia (C_m) e padrão de postura Exclusiva ou Facultativamente Agrupado (B_f e B_e) (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974; DRUMOND et al. 1996a; 1996b; 1997; 1998; SAKAGAMI et al. 1993).

Em relação às demais espécies do gênero, a postura Singular (B_s) em *P. lucii* é mais próxima a observada em *P. poecilochroa* (1 – 9; $5,1 \pm 2,2$) e *P. julianii* (1 – 3; $1,7 \pm 0,7$) que, por possuírem padrão de postura Facultativamente Agrupado, podem apresentar alguns POPs com postura única (DRUMOND et al. 1997; 1998). Outras espécies do gênero apresentam maiores números de células por POP: *P. droryana*: 5 - 40 ($21,3 \pm 6,5$) (DRUMOND et al. 1996a); *P. emerina*: 17 - 74 ($47,1 \pm 17$); e *P. remota*: 7 - 30 ($17,87 \pm 6,1$) e 6 - 26 ($17,3 \pm 5,8$) (DRUMOND et al. 1996b).

Uma única postura por POP observada em *P. lucii* é típica em *Austroplebeia symei* Rayment e *A. australis* que dispõem a cria em cacho (DRUMOND et al. 1999). Em outras duas espécies com esta mesma disposição de células de cria, *L. muelleri* e *T. duckei*, o número de ovos postos, respectivamente, 3 - 13 (6,6) e 2 - 4 (3), são menores se comparadas às supracitadas espécies de *Plebeia*, mas não chegam a ser singular (SAKAGAMI et al. 1993; SAKAGAMI & ZUCCHI 1974). Em *F. schrottkyi*, cujas células de cria são dispostas em favo irregular, o tamanho da postura varia de 1 – 16 ($9 \pm 1,83$) podendo, assim, também apresentar alguns processos isolados de postura (SAKAGAMI et al. 1973). O tamanho reduzido da postura pode ser uma tendência em espécies com cria dispostas em formato mais aberto (favo irregular ou em cacho).

A ampla variação na duração da fase de construção das células em *P. lucii* pode ter sido devido a uma possível inclusão do período de Extraoviposição na contagem de tempo de alguns casos enquanto em outros não. Algumas fases de construção ocorreram mais rapidamente quando POPs paralelos foram realizados, enquanto outras receberam lenta manipulação por operárias durante longos períodos de Extraoviposição. Nestes últimos casos, inspeções e presença da rainha próxima a estas células, não necessariamente indicaram um início do período de oviposição, uma vez que em *P. lucii*

o descanso sobre o favo é comum. As rápidas construções podem ter resultado da ausência da fase de Extraoviposição entre POPs sucessivos, de modo que apenas as fases de patrulhamento e excitação ocorreram.

Apesar de a construção de novas células em *P. lucii* ocorrer apenas próximo às operculadas anteriormente, e não de modo tão específico quanto em *N. testaceicornis* na qual as células são construídas exatamente ao lado de uma que recentemente recebeu postura (SAKAGAMI et al. 1993), é provável que esta proximidade entre células em construção e células recém operculadas influencie na velocidade da construção. A atmosfera altamente excitada durante o POP em uma célula poderia estar exercendo fortes influências sobre a atmosfera de uma construção próxima. O fator excitação durante a construção em *L. muelleri* tem fortes implicações na duração desta fase (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974).

As construções de célula em *P. lucii* ($126,52 \pm 69,51$ min) são mais rápidas que em *P. droryana* ($214,5 \pm 39,2$ min) (DRUMOND et al. 1996a), *P. remota* ($4 \pm 0,6$ h) (DRUMOND et al. 1996b) e *P. poecilochroa* (456 ± 124 min) (DRUMOND et al. 1997), mas a construção nestas espécies envolve maiores número de células por POP. *Plebeia julianii* ($127 \pm 11,8$ min) além de ser a com menor número de postura por POP antes de *P. lucii*, também é a que mais se assemelha a ela na reduzida duração da fase de construção (DRUMOND et al. 1998). É provável que construções mais rápidas compensem posturas reduzidas ou singulares por POP.

Outro fator que pode influenciar o tempo para completar a construção de uma célula é a condição da colônia. Em *S. postica* este variou em colônias fortes e fracas e, em alguns casos, houve oviposição mesmo com a construção incompleta da célula (SAKAGAMI & ZUCCHI 1963). Neste estudo, os dados relativos aos POPs de *P. lucii* foram obtidos em intervalos curtos de tempo, de modo a evitar possíveis influências de variações nas condições das colônias. Desta forma, as variações observadas nas fases de construção, assim como nas demais, não podem ser atribuídas a este tipo de influência.

4.1.3. Comportamento antes do provisionamento

A sequência comportamental durante \bar{P} e \bar{A} em *P. lucii* ocorre como na maioria dos meliponídeos (SAKAGAMI E ZUCCHI 1974): à medida que fase final da construção se aproxima, há aumento no número de operárias e grau de excitação. Após

fixação e início da espera pré-descarga ($\overline{p\bar{r}}$), a rainha permanece na célula até que o aprovisionamento inicie. É interessante que após o início desta fase não necessariamente as operárias iniciam imediatamente a regurgitação. Operárias e rainha ainda podem se revezar inúmeras vezes ao se inserir na célula e a rainha pode, após um tempo de espera, caminhar sobre a mesma batendo as asas freneticamente. Isto se assemelha a *P. julianii*, cuja rainha pode realizar até seis inspeções nas células em colar de um POP na fase pré-aprovisionamento (DRUMOND et al. 1998), mas difere de *T. duckei*, cuja rainha não realiza inserção na célula nesta fase, e de *L. muelleri* na qual a rainha passa mais tempo cruzando o favo do que esperando nas células (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974).

A fixação única em *P. lucii* difere da observada em *S. postica* cuja rainha faz várias alternâncias entre descansar e fixar até que a fixação definitiva ocorra durante vários minutos e, com ela, a primeira descarga de alimento larval dentro da célula na qual ela esta fixada (SAKAGAMI & ZUCCHI 1963).

4.1.4. Aprovisionamento, oviposição da rainha e operculação

O início do aprovisionamento em *P. lucii* é liberado pela fixação da rainha nas células prontas. Como em *S. postica*, o comportamento da operária em *P. lucii* no momento da regurgitação é evidentemente diferente da simples inserção do corpo na célula onde a rainha esta fixada, devido à distinta contração do metassoma e reação de fuga exagerada após aprovisionamento. No entanto, o comportamento em *S. postica* de inserir a porção anterior do corpo e manter tal postura durante alguns segundos sem se movimentar antes de aprovisionar (SAKAGAMI & ZUCCHI, 1963), ocorre mais nitidamente apenas na primeira operária de *P. lucii*. As operárias subsequentes geralmente realizam nítida contração do metassoma logo que se inserem na célula. Como em outros meliponídeos e espécies de *Plebeia* estudadas, a descarga de alimento pela primeira operária aumenta a agitação em torno da célula (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974; DRUMOND et al. 1996a; 1996b; 1997; 1998).

Em *P. lucii* a duração da fase de descarga ($13,62 \pm 4,92$ s) e número de regurgitações ($4,91 \pm 1,81$) foram menores do que o observado em *P. droryana* ($19,3 \pm 3$ s) ($5,1 \pm 0,7$ regurgitações) (DRUMOND et al. 1996a), *P. julianii* ($19,9 \pm 6,1$) ($7,4 \pm 1,2$) (DRUMOND et al. 1998), *P. poecilochroa* ($68,7 \pm 30,9$ s) ($11,6 \pm 2,3$) (DRUMOND et al. 1997) e *P. remota* ($46,8 \pm 12,4$ s) ($7,4 \pm 1,6$) (DRUMOND et al.

1996b). Nestas espécies o provisionamento em uma célula é Sincrônico e, desta forma, não ocorre apenas quando a rainha chega à célula, mas em rápida sucessão após o provisionamento da primeira daquele mesmo POP. Desta forma as células recebem várias regurgitações e ainda há uma fase de espera até a chegada da rainha na célula provisionada. Em *P. lucii* a rápida inserção da rainha na célula após as regurgitações reduz o número destas e a duração da fase.

Em *P. lucii* esta limitação no número de regurgitações se deve ao fato de a rainha estar ao lado da célula e inserir-se rapidamente assim que algumas regurgitações são realizadas. A ausência de um período de espera pós-provisionamento também poderia não dar espaço para exibições de alguns comportamentos observados em outras espécies nesta fase, como, por exemplo, o de agitação de operárias após a regurgitação em *S. postica*. Este é caracterizado por contínuas inserções momentâneas de operárias na célula apresentando um peculiar tremor de corpo e direcionamento de antenas e pernas anteriores para a rainha aparentando defesa de território contra ela (SAKAGAMI & ZUCCHI 1963).

A hipótese de limitação no número de regurgitações em *P. lucii* aqui proposta foi reforçada pelo caso atípico com mais de 100 inserções na fase de regurgitação na colônia IV. Apesar das operárias apresentarem tremores no corpo, nenhuma reação contra a rainha e aparente defesa de célula foi observada. Tal fato evidencia que as operárias assumem um comportamento em frenesi na fase de regurgitação com contínua inserção na célula até que a rainha impeça sua continuidade com a oviposição. Este comportamento também foi evidenciado nas descrições sobre o processo de provisionamento de células em colônias órfãs (célula auxiliar e célula para postura de operária).

O número e duração das fases de inspeções (\bar{o}_i) em *P. lucii* podem estar relacionados com a duração do período Extraoviposição e ausência de alternativas para alimentação da rainha. A ausência de alimentação da rainha por trofalaxis ou ovos tróficos poderia explicar a ocorrência de \bar{o}_i em quase totalidade dos POPs observados. Os resultados aqui obtidos levantam a hipótese de que a primeira \bar{o}_i após um longo período de Quiescência poderia ser mais demorada ou acontecer um maior número de vezes devido ao grande período da rainha sem se alimentar. A duração e número de inspeções diminuiriam nas células dos POPs subsequentes.

A ingestão de alimento em *S. postica*, na qual também não ocorre alimentação da rainha por trofalaxis, também é demorada (5 - 7 s). Nesta espécie a ingestão de alimento larval e de ovos de operárias durante o POP é a principal fonte de alimento da rainha e casos em que a regurgitação foi retardada, a rainha mostrou urgência para receber alimento visitando frequentemente o favo com crias novas e chegando a abrir células e ingerir alimento (SAKAGAMI & ZUCCHI 1963). Em *A. symei* e *A. australis* a fase de inspeção também é a principal fonte de alimento da rainha, uma vez que nestas espécies trofalaxis é ausente e ovos tróficos raros (DRUMOND et al. 1999).

Isto difere de outras espécies de *Plebeia* cujas \bar{o}_i são caracterizadas como raras e curtas, provavelmente devido ao fato da rainha nestas espécies obter alimento através de formas alternativas no período de Extraoviposição. Em *P. poecilochroa* a rainha se alimenta de ovos tróficos e por trofalaxis e sua \bar{o}_i é rápida e ocorre apenas nas primeiras células postas de um mesmo POP (DRUMOND et al. 1997). Em *P. droryana*, *P. emerina* e *P. remota* a rainha também realiza curta \bar{o}_i apenas antes da sua primeira oviposição, e esta também se alimenta de ovos tróficos antes do POP e trofalaxis é descrita como rara ou inexistente (DRUMOND et al. 1996a; 1996b).

Em abelhas sem ferrão a alimentação da rainha por trofalaxis é considerada relativamente rara, sendo poucos os registros de sua ocorrência nas diversas espécies de Meliponini (SAKAGAMI & ZUCCHI 1963). Quando em uma espécie há ausência de ovos tróficos, como observado em *P. lucii*, o aumento da duração e número de ingestões de alimento larval (\bar{o}_i) no POP poderiam ser a alternativa encontrada ao longo da evolução do grupo para alimentação da rainha.

A oviposição da rainha em *P. lucii* (10,27 - 18,67 s; $13,96 \pm 2,69$; n= 11) é mais demorada do que em *P. droryana* (1,2 - 5,8seg; $2,7 \pm 0,9$; n= 100), *A. symei* ($1,36 \pm 0,52$ s) e *A. australis* ($1,68 \pm 0,8$ s) (DRUMOND et al. 1996a; 1999). Além das contrações metassomais e movimentos de antena e pernas dianteiras, suas asas realizam uma batida curta e rápida semelhante ao observado em *P. poecilochroa* (DRUMOND et al. 1997).

O fechamento da célula em *P. lucii* não é iniciada imediatamente após a oviposição, diferentemente do observado em *S. postica* (SAKAGAMI & ZUCCHI 1963), na qual a rotação inicia imediatamente após a oviposição, e de *P. droryana*, na

qual \overline{sp} é rara ou curta (DRUMOND et al. 1996a). Em *F. schrottkyi* há uma fase de espera pré-operculaçaõ (1,85 ± 1,03) mais curta do que em *P. lucii* (4,82 ± 5,84 s).

O modo de fechamento da célula em *P. lucii* se assemelha ao de *F. schrottkyi*, pois não são realizados através de rotaçaõ realizada por uma operária, mas sim por várias manipulando lateralmente a cera com a cabeça voltada para o orifício da célula (SAKAGAMI et al. 1973). No entanto, em *P. lucii* normalmente a operculaçaõ é iniciada por uma operária e, subsequentemente, até sete outras operárias também o fazem trabalhando lado a lado, enquanto que em *F. schrottkyi* de cinco a seis operárias participam da operculaçaõ desde o início. Estas duas espécies envolvem um número consideravelmente maior de operárias nesta fase do que o observado em outras espécies de *Plebeia* (DRUMOND et al. 1996a; 1996b; 1997; 1998), uma vez que não são limitadas pela atividade de rotaçaõ a qual permite que apenas uma operária realize o processo. Em *P. lucii* e *F. schrottkyi* trabalham na operculaçaõ quantas operárias couberam lado a lado no entorno da abertura da célula, resultando em números semelhantes de operárias envolvidas no processo.

O tempo para fechamento de uma célula em *P. lucii* (258 ± 0,97 s) foi mais demorado do que o observado em *P. droryana* (101,3 ± 14,6 s) (DRUMOND et al. 1996a) e *F. schrottkyi* (119,32 ± 31,99 s) (SAKAGAMI et al. 1973).

A operculaçaõ realizada no caso atípico da colônia IV, em uma célula que havia sido inspecionada pela rainha, mas que não havia recebido postura indica o quanto o POP na espécie é estereotipado em uma sequência ritualizada executada pelas operárias que é finalizada mesmo na ausência de postura pela rainha.

4.1.5. Postura por operárias

O comportamento de oviposicãõ por operárias de *P. lucii* ausente em colônias com rainha e frequentes em colônias órfãs, indica inibiçaõ química da ativaçaõ de ovários ou postura de operárias. Em *Friesella schrottkyi* Friese (Apidae: Meliponini) hidrocarbonetos cuticulares nas rainhas inibem a ativaçaõ dos ovários das operárias (NUNES et al. 2015). O fato das colônias de *P. lucii* apresentarem um período longo de latência (26,33 dias) para a produçaõ de células de macho após a retirada da rainha também suporta a hipótese de inibiçaõ química. Ao contrário de *P. lucii*, posturas por operárias em colônias com rainha em espécies do gênero é algo comum e normalmente

tem apenas função trófica alimentando principalmente a rainha antes e durante eventos de POP (DRUMOND et al. 2000). Além disso, em *P. droryana* a rainha pode estimular as operárias a coloca-los através da retenção de operárias pelas mandíbulas acompanhadas por violentas tapeadas com as antenas e pernas dianteiras (DRUMOND et al. 1996a).

Ausência de postura por operárias em colônias com rainha foi descrito para *P. minima* (DRUMOND et al. 2000). Entretanto, estes autores descrevem e comparam características de três colônias de *P. minima* e consideram que estas eram sem dúvida espécies distintas entre si. Conforme informações cedidas por CAMPOS (Comunicação pessoal, 2016) e outras semelhanças com os resultados aqui obtidos, como ausência de invólucro ou pilares, operculação de célula realizada sem rotação e realizada por de cinco a seis operárias, oviposição singular e ausência de respostas hipnóticas pelas operárias, a colônia de *P. minima* que não apresentou postura de operárias era de fato *P. lucii*.

4.2. ADIÇÃO DE CÉLULAS AUXILIARES (ACA)

O elevado número de células auxiliares em colônias órfãs de *P. lucii* indica a perda da rainha como gatilho para produção de rainhas de emergência. Este comportamento é típico em *Apis* porque suas colônias não produzem rainhas frequentemente, mas apenas em períodos de formação de colônias filhas. No entanto, Meliponini produz gynes ao longo do ano (MICHENER 1974; IMPERATRIZ-FONSECA E ZUCCHI 1995) e caso a rainha seja perdida sem outra para substituí-la a continuidade da colônia é, geralmente, comprometida. Produção de rainhas de emergência em abelhas sem ferrão através da adição de célula auxiliar seria uma alternativa a estas raras situações.

Plebeia lucii tem alto investimento nesta produção independentemente da colônia conter células de rainha em desenvolvimento ou mesmo gynes em celas de aprisionamento. Larvas que dariam origem a operárias têm seus destinos alterados para rainhas e apenas uma delas se estabelecerá na colônia. Desta forma, um trade-off na produção de novas rainhas ocorre em detrimento do desenvolvimento de futuras operárias. Isto pode ter influências negativas na sobrevivência da colônia, se somado a redução populacional e enfraquecimento resultantes da parada no POP. Aparentemente,

a produção de uma nova rainha é prioridade mesmo com alto custo energético em termos de operárias mantenedoras da colônia. Isto não se aplicaria à *F. varia* que apresenta a adição de células auxiliares de oito a treze dias após a retirada da rainha. Em condições naturais, este poderia ser um intervalo durante o qual a substituição se daria por uma rainha produzida previamente e, assim, não haveria necessidade de produção de rainhas de emergência (FAUSTINO et al. 2002).

O fato das colônias órfãs de *P. lucii* retomarem o comportamento de adição quando novas células de cria foram inseridas indica que o fator limitante para a produção de rainhas de emergência é a disponibilidade de células em idade ideal. Em condições naturais, a adição dessas células ocorre, provavelmente, dentro de uma janela temporal definida pela idade das larvas em desenvolvimento. Desta forma, a alta frequência de adições poderia aproveitar ao máximo as células disponíveis em curto espaço de tempo para alteração do destino das larvas. Operárias retomam a construção de células auxiliares assim que novas células são introduzidas experimentalmente na colônia órfã como um reflexo deste comportamento. Em *Apis* o destino pode ser alterado até o terceiro dia de desenvolvimento larval (FELL & MORSE 1984). Em *F. varia* há indícios de que disponibilidade de larvas jovens seja um fator para adição de célula auxiliar (FAUSTINO et al. 2002).

A idade das operárias de *P. lucii*, envolvidas nos trabalhos de construção e aprovisionamento de células auxiliares, foi semelhantes à das operárias de *Scaptotrigona postica* Latreille (10 a 20 dias) e *P. remota* Holmberg (12 a 24 dias) (Apidae: Meliponini) envolvidas na construção e aprovisionamento de células de cria (POP) (SAKAGAMI & ZUCCHI 1963; van BENTHEM et al. 1995). Na casta operária, a divisão de trabalho segue uma sequência ontogenética flexível de atividades (polietismo etário) que pode ser influenciada por necessidades internas da colônia e idade das operárias, sendo que operárias mais novas geralmente estão envolvidas em atividades relacionadas à produção de cria (MICHENER 1974; CEPEDA 2006; GIANNINI 1997). Os resultados obtidos indicam que esta tendência também se aplica a operárias trabalhando na construção da célula auxiliar em colônias órfãs.

O local para a adição da célula juntamente com a fase de Formação da Concavidade são etapas importantes para o futuro processo de perfuração pela larva. As construções próximas à região posterior da larva podem dificultar o acesso à célula

auxiliar. A manipulação da cera resulta em uma única parede entre as células auxiliar e larval caracterizada por ser fina e projetada para o seu interior (concavidade), o que pode facilitar a localização e perfuração da parede pela larva. É possível que fatores relacionados ao sexo também interfiram neste processo, uma vez que larvas macho não perfuraram células auxiliares.

O início e posterior interrupção das atividades de construção de uma célula auxiliar em colônias órfãs de *P. lucii* levantam questões sobre o caráter do estímulo para a construção da mesma. Este estímulo poderia atrair ou sinalizar operárias para a adição e cessar antes da conclusão do processo. A mudança do local de construção ou a formação final de duas células auxiliares em uma mesma célula também sugerem que tal estímulo poderia mudar de posição em relação à superfície da célula. O fato de células auxiliares terem sido adicionadas em células com postura de operárias aponta que tal estímulo deve estar presente em larvas de ambos os sexos.

A defecação pela larva pode ser delimitadora do fim da janela temporal para adição da célula auxiliar, uma vez que a larva não se alimenta após realizá-la. No entanto, sua ausência não poderia funcionar como estímulo ou atratividade para adição da célula uma vez que dezenas de células contêm larvas pré-defecantes e apenas em algumas delas a célula auxiliar é adicionada. É provável que tal estímulo seja proveniente de alguma estrutura da larva e que por isso possa mudar de posição dentro da célula juntamente com movimentações da mesma.

Em *Apis mellifera* há indícios de que a alimentação diferencial de larvas para produção de rainhas de emergência não é feita randomicamente, mas através da seleção de genótipos com baixa frequência na colônia (subfamílias reais raras) (MORITZ et al. 2005). Operárias podem, também, selecionar larvas totalmente irmãs (preferência patrilinear) e, assim, aumentar seu fitness inclusivo (CHÂLINE et al. 2003). Apesar das evidências genéticas, mecanismos para estas seleções de larvas são desconhecidos. Em Meliponini, possíveis seleções são dificultadas pela ausência do contato direto entre larvas e operárias observado em colônias de *Apis*. O fato de células auxiliares serem adicionadas à células com larva macho também indicam pequena capacidade discriminatória das operárias nesta espécie.

A construção da célula em relação à posição da larva pode ter influências no sucesso de perfuração da parede em comum e consequente alimentação extra pela larva. Isto é reforçado pelos dados de Raios-X que mostraram a larva de *P. lucii* executando ativa, mas limitada movimentação dentro da célula. Células auxiliares construídas próximas à região posterior da larva são mais dificilmente alcançadas. Isto poderia explicar os casos de construção de duas células auxiliares em posições diferentes em uma mesma célula e também os casos de esvaziamento da célula auxiliar com aparente defecação pela larva antes de perfurar a parede e ingerir o alimento extra.

O caso da célula auxiliar adicionada na colônia II que foi desfeita pelas operárias após aparente defecação da larva, e de cuja célula emergiu uma rainha, indica que uma larva mesmo tendo perfurado a parede da célula auxiliar pode empupar dentro do espaço da sua própria célula.

Apesar do comportamento construção de célula de rainha ser considerado como homólogo em abelhas sem ferrão (NUNES et al. 2015), os comportamentos de perfuração de célula vizinha podem não ter uma única origem, uma vez que diferem grandemente entre si e quando comparados com o elaborado e específico processo de adição de célula auxiliar em *P. lucii*. A homologia do comportamento de perfuração em *T. carbonaria*, *Frieseomelitta*, *A. australis* e *P. lucii* precisa ser estudada com mais detalhes considerando os processos comportamentais de perfuração e adição.

4.3. POP e ACA

O processo de adição de célula auxiliar em colônias órfãs de *P. lucii* pode ser considerado como ritualizado e semelhante em alguns aspectos ao POP, mesmo com a ausência da rainha. Uma das semelhanças foi que células construídas nos dois processos, uma vez provisionadas, foram operculadas, não sendo esvaziadas nem mesmo nos casos de ausência de postura. Outra semelhança diz respeito à duração total e a duração da operculação principal entre os dois processos, apesar das células auxiliares apresentarem a fase de transição com algumas operárias atrasando o processo de operculação.

No POP de *P. lucii* a duração da fase de descarga e número de regurgitações sofrem influência da presença da rainha que permanece fixada ao lado da célula e se insere rapidamente assim que algumas regurgitações são realizadas. Isto reduz o número

e a duração da fase. A duração da regurgitação na célula auxiliar foi maior do que durante o POP e isto provavelmente devido à ausência da rainha como limitação ao frenesi de inserção das operárias e por incluir a fase de transição com operárias impedindo o avanço da operculação.

As oviposições mais demoradas por operárias podem evidenciar diferenças fisiológicas em relação às rainhas na velocidade de liberação de ovócitos.

4.4. PRODUÇÃO DE CÉLULAS PARA APROVISIONAMENTO E POSTURA POR OPERÁRIAS EM COLÔNIAS ÓRFÃS (POP_w)

Células produzidas em colônias órfãs de *P. lucii* apresentaram cera com aspecto inicial mais escuro e grosso do que as resultantes de POP e ACA. Isto pode indicar um trabalho de refinamento de cera diferenciado dos demais. Algumas células construídas muito próximas umas das outras, fora os casos de adição de célula auxiliar, indicam certo grau de desorganização que não traz desvantagem à sobrevivência dos indivíduos ali em desenvolvimento (ocorrência de larvofagia), uma vez que há indícios de que machos não perfuram paredes de células adjacentes (seção 4.2). Mudanças em aspectos das células de cria quando em condição órfã também ocorrem em *T. carbonaria*, mas nesta espécie o que varia é a disposição dos favos de em espiral para irregular (NUNES et al. 2015).

Diferente do observado no POP e ACA, células de macho construídas e aprovisionadas em *P. lucii* foram operculadas apenas quando receberam postura. Isto difere de *Partamona testacea* Klug e *A. symei* nas quais células podem ser fechadas após aprovisionamento sem receber um ovo ou mesmo, nesta última espécie, fechadas completamente vazias (SAKAGAMI et al. 1964; DRUMOND et al. 1999).

Em *P. lucii* foi possível observar esvaziamento apenas nas primeiras células construídas nas colônias órfãs após alguns minutos de simulação de postura por operárias sem efetiva ocorrência da mesma. Isto difere de *L. mulleri* cujas células aprovisionadas são mais frequentemente esvaziadas do que recebem postura (SAKAGAMI & ZUCCHI 1974) em colônias órfãs.

É possível que operárias de *P. lucii* que simularam oviposição nas referidas primeiras células de macho construídas apresentassem ovócitos em desenvolvimento,

mas não prontos para a postura e que o consequente esvaziamento de células tenha mais relação com um reduzido número de operárias com ovários em ativação do que com uma total ausência de ovários ativos. Isto foi reforçado por paralelamente outras células recém-operculadas contendo ovos serem encontradas.

Aumento gradual do número de operárias com ovários ativados em colônias órfãs de *P. lucii* foi suportado pelos fatos de que com o passar do tempo: 1- o esvaziamento de células devido a não ocorrência de postura ter se tornado raro; 2- as posturas por operárias em uma célula terem aumentado de uma para até quatro; 3- a construção de células passou de singular para múltipla; 4- a ocorrência de reabertura de células recém operculadas para oviposição ter se tornado frequente. Em colônias órfãs de *P. testacea* a ativação de ovários de operárias é não sincrônica. Nesta espécie, apenas operárias que trabalham na região da cria, contém muito pólen no papo e possuem glândulas hipofaríngeas e de cera desenvolvidas apresentam ovários ativos. Reabertura de célula para oviposição também ocorre nesta espécie (SAKAGAMI et al. 1964).

Construções de células de macho e postura por operárias em colônias de *P. lucii* 26 dias após o início da condição órfã, indicam que a inibição de postura por operárias em colônias com rainha não ocorre apenas através de simples inibição comportamental da oviposição, mas possivelmente envolvendo químicos e inativação de ovários. Isto também foi evidenciado quando em um POPw de uma colônia que há 37 dias estava ativamente produzindo células de macho, a célula foi esvaziada após não ter recebido postura e em cujas proximidades havia uma rainha virgem em descanso. Este fato levanta a possibilidade de químicos liberados pela rainha de *P. lucii* poderem atuar sobre a ativação de ovários e/ou supressão da oviposição.

Estes dados são congruentes com outros encontrados em uma colônia de *A. symei* encabeçada por uma rainha virgem cujas operárias não realizaram postura após 21 dias de ausência da rainha fisogástrica, mesmo com maior parte das operárias contendo ovócitos bem desenvolvidos. Nesta mesma espécie, operárias em colônias sem rainha apesar de apresentarem ovócitos em desenvolvimento após 15 dias nesta condição, só iniciaram postura após 27 dias de orfandade (DRUMOND et al. 1999).

Os dois tipos de ovos de operárias observados em colônias órfãs de *P. lucii* se assemelham aos observados em *Scaptotrigona*, *P. droryana*, *P. emerina* e *P. remota* (BEIG 1972; DRUMOND et al. 1996a; 1996b) diferenciando-se apenas pelo fato de o ovo trófico não ser amarelado. É possível que o ovo trófico de *P. lucii* seja mais semelhante ao fluído metassomal observado nas três espécies de *Plebeia* supracitadas, uma vez que ambos, tal como uma gota, são imediatamente ingeridos por uma operária próxima.

5. CONCLUSÃO

O padrão geral do POP em *P. lucii* foi semelhante ao observado em outras espécies de Meliponini, exceto pelo padrão de postura Predominantemente Singular e operculação sem ser por rotação que são relativamente raros na tribo. O POP na espécie é altamente estereotipado, pois uma vez iniciado é concluído mesmo em casos com algum comportamento atípico (atraso no início da regurgitação ou ausência de postura). Não ocorrência de comportamentos hipnóticos e de postura por operárias em *P. lucii* indicaram evolução diferenciada nas interações de dominância entre rainha e operária em relação às demais espécies do gênero. A adição de célula auxiliar é o modo natural de produção de rainhas em *P. lucii*, possibilitando as de emergência em colônias órfãs. Ela envolveu seqüências comportamentais específicas e elaboradas, não podendo ser confundida com simples perfuração de célula vizinha ou construção de células por operárias para oviposição e indica origem independente deste comportamento em *P. lucii*. A formação de concavidade e o local de construção da célula auxiliar em relação à posição da larva são importantes para o sucesso de perfuração da célula anexa. Postura por operárias ocorreu apenas em colônias órfãs em células totalmente construídas e aprovisionadas, com ocorrência de múltiplas posturas em uma mesma célula e de oofagia apenas de ovos tróficos, o que indicou certo grau de organização na produção de células de macho mesmo na ausência da rainha. As descrições aqui apresentadas podem ser úteis para novos estudos filogenéticos do gênero com caracteres comportamentais mais detalhados em *P. lucii*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bego, L.R. (1982) On social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille, with special reference to male production cycles (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo** 7: 181-196.
- Beig, D. (1972) The production of males in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. **Journal Apicultural Research** 11(1): 33-39.
- Châline, N.; Ratnieks, F.L.W.; Arnold, G. & Papin, C. 2003. Patriline differences in emergency queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. **Insectes sociaux** 50(3): 234-236.
- Cepeda, O.I. (2006). Division of labor during brood production in stingless bees with special reference to individual participation. **Apidologie** 37(2): 175.
- Cruz-Landim, C. (2000) Ovarian development in Meliponine bees (Hymenoptera, Apidae): the effect of queen presence and food on workers ovary development and egg production. **Genetics and Molecular Biology** 23(1): 83-88.
- Drumond, P.M.; Bego, L.R.; Zucchi, R.; Yaman, S.; Mateus, S. & Sakagami, S.F. (1997) Oviposition behavior of the stingless bees, XIX. *Plebeia (Plebeia) poecilochroa* with highly integrated oviposition process and small colony size. **Japan Journal Entomology** 65(1): 7-22.
- 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). **Australian Journal of Entomology** 38(3): 234-241. DOI: 10.1046/j.1440-6055.1999.00098.x.
- Drumond, P.M.; Zucchi, R.; Mateus, S.; Bego, L.R.; Yamane, S. & Sakagami, S.F. (1996a) Oviposition behavior of the stingless bees, XVII. *Plebeia (Plebeia) droryana* and an ethological comparison with other Meliponine taxa (Hymenoptera, Apidae). **Japan Journal Entomology** 64(2): 385-400.
- Drumond, P.M.; Zucchi, R.; Yamane, S. & Sakagami, S.F. (1996b) Oviposition behavior of the stingless bees, XVIII. *Plebeia (Plebeia) emerina* and *P. (P.) remota* with a preliminar ethological comparison of some *Plebeia* taxa (Apidae,

- Meliponinae). **Bulletin of the Faculty of Education, Ibaraki University** (Nat. Sci.) 45: 31-55.
- Drumond, P.M.; Zucchi, R.; Yamane, S. & Sakagami, S.F. (1998) Oviposition behavior of the stingless bees, XX. *Plebeia (Plebeia) julianii* which forms very small brood batches (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Entomological Science** 1(2): 195-205.
- Drumond, P.M.; Zucchi, R. & Oldroyd, B.P. (2000) Description of the cell provisioning and oviposition process of seven species of *Plebeia* Schwarz (Apidae, Meliponini), with notes on their phylogeny and taxonomy. **Insectes Sociaux** 47: 99-112.
- 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**. Engels, W. (Ed.) Berlin: Springer-Verlag. pp 167–230.
- Fadil, J.P.R.; Mateus, S.; Nunes, T.M. & Nascimento, F.S. (2012) Production of new queens in queenless colonies of *Frieseomelitta languida* Moure 1990 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Anais do X Encontro Sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, SP, Brasil. p 411.
- Faustino, C.D.; Silva-matos, E.V.; Mateus, S. & Zucchi, R. (2002) First record of emergency queen rearing in stingless bees. **Insectes Sociaux** 49: 111-113.
- Fell, R.D & Morse, R.A. (1984) Emergency queen cell production in the honey bee colony. **Insectes Sociaux** 31(3): 221-237.
- Giannini, K.M. (1997). Labor division in *Melipona compressipes fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 26(1): 153-162.
- Hartfelder, K.; Makert, G.R.; Judice, C.C.; Pereira, G.A.G.; Santana, W.C.; Dallacqua, R. & Bitondi, M.M.G. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie** 37: 144-163. DOI: 10.1051/apido:2006013.

- Imperatriz-Fonseca, V.L. & Zucchi, R. (1995) Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. **Apidologie** 26: 231-244.
- Jarau, S.; van Veen, J.W.; Twele, R.; Reichle, C.; Gonzales, E.H.; Aguilar, I.; Francke, W. & Ayasse, M. (2010). Workers make the queens in *Melipona* bees: identification of geraniol as a caste determining compound from labial glands of nurse bees. **Journal of Chemical Ecology** 36: 565-569. DOI 10.1007/s10886-010-9793-3.
- Koedam D.; Velthuis, H.H.W; 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*. **Physiological Entomology** 26: 254-259.
- Lacerda, L.M. & Simões, Z.L.P. (2006) Ovos produzidos por rainhas e operárias de *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina): morfometria e aspectos relacionados. **Iheringia** 96(1): 89-93.
- Lacerda, L.M. & Zucchi, R. (1999) Behavioral alterations and related aspects in queenless colonies of *Geotrigona mombuca* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Sociobiology** 33(3): 277-288.
- Lacerda, L.M.; Simões, Z.L.P. & Velthuis, H.H.W. (2010) The sharing of male production among workers and queens in *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) (Apidae, Meliponini). **Insectes Sociaux** 57:185–192. doi: 10.1007/s00040-010-0070-9.
- Lacerda, L.M.; Zucchi, R. & Sakagami, S.F. (1998) Oviposition behavior of the stingless bees, XXV. Ethological relationships of *Geotrigona mombuca* to other stingless bees taxa (Insecta: Hymenoptera; Apidae, Meliponinae). **Natural History Bulletin of Ibaraki University** 2: 263-276.
- Michener, C.D. (1974) **The social behavior of the bees**. Harvard University Press, Cambridge, 404p.
- Michener, C.D. (2007) **The bees of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 953p.

- Moritz, R.F.; Lattorff, H.M.G.; Neumann, P.; Kraus, F.B.; Radloff, S.E. & Hepburn, H.R. (2005). Rare royal families in honeybees, *Apis mellifera*. **Naturwissenschaften** 92(10): 488-491.
- Moure, J.S (2004) Duas novas espécies de *Plebeia* Schwarz do Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 48(2): 199-202.
- Noll, F.B. & Zucchi, R. (2010) On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees seen in a phylogenetic perspective (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A preliminary approach. In: Szumik, C. & Goloboff, P. A summit of cladistics: abstracts of the 27th Annual Meeting of the Willi Hennig Society and VIII Reunión Argentina de Cladística y Biogeografía. **Cladistics** 26: 202–226. doi: 10.1111/j.1096-0031.2009.00285.x.
- Nunes, T.M.; Heard, T.A.; Venturieri, G.C. & Oldroyd, B. (2015) Emergency queens in *Tetragonula carbonaria* (Smith, 1854) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Austral Entomology** 54(2): 154-158.
- Pereira, R.A.; Morais, M.M. & Bego, F.N.L. (2009). Intrinsic colony conditions affect the provisioning and oviposition process in the stingless bee *Melipona scutellaris*. **Genetics and Molecular Research** 8(2): 725-729.
- Pereira, R.A; Morais, M.M; Gioli, L.D.; Nascimento, F.S.; Rossi M.A. & Bego, L.R. (2006). Comparative morphology of reproductive and trophic eggs in *Melipona* bees (Apidae, Meliponini). **Brazilian Journal of Morphological Sciences** 23(3-4): 349-354.
- Ribeiro, F.M.; Imperatriz-Fonseca, V.L. & Santos-Filho, P.S. (2003) Exceptional high queen production in the brazilian stingless bee *Plebeia remota*. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 38(2): 111-114.
- Ribeiro, F.M.; Santos-Filho, P.S. & Imperatriz-Fonseca, V.L. (2006a) Size variation and egg laying performance in *Plebeia remota* queens (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Apidologie** 37(6): 1-12. doi: 10.1051/apido:2006046.

- Ribeiro, M. F.; Wenseleers, T.; Santos Filho, P. S. & Alves, D. A. (2006b). Miniature queens in stingless bees: basic facts and evolutionary hypotheses. **Apidologie** 37(2): 191-206.
- Sakagami, S.F. & Zucchi, R. (1963) Oviposition process in a stingless bee, *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latr. (Hym.). **Studia Entomologica** 6(4): 497-510.
- Sakagami, S.F. & Zucchi, R. (1974) Oviposition behavior of two dwarf stingless bees, *Hypotrigona (Leurotrigona) muelleri* and *H. (Trigonisca) duckei*, with notes on the temporal articulation of oviposition process in stingless bees. **Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University** 19(2): 361-421.
- 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. **Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University** 15(4): 578-607.
- Sakagami, S.F.; Beig, D. & Akahira, Y. (1964) Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process III. Appearance of laying workers in an orphan colony of *Partamona (Partamona) testacea testacea* (KLUG). **Japanese Journal of Ecology** 14(2): 20-57.
- Sakagami, S.F.; Beig, D.; Zucchi, R. & Akahira, Y. (1963) Occurrence of ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bees. **Revista Brasileira de Biologia** 23(2): 115-129.
- Sakagami, S.F.; Zucchi, R.; Bego, L.R.; Sanctis, M. & Mateus, S. (1993) Oviposition Behavior of the Stingless Bees XV. *Nannotrigona testaceicornis* and its strictly integrated oviposition process (Apidae, Meliponinae). **Japan Journal Entomology** 61(2): 234-340.
- Sakagami, S.F.; Camilo C. & Zucchi R. (1973) Oviposition behavior of a Brazilian stingless bee, *Plebeia (Friesella) schrottkyi*, with some remarks on the behavioral evolution in stingless bees. **Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University** 19(1): 163-187.

- Schwander, T.; Lo, N.; Beekman, M.; Oldroyd, B.P. & Keller, L. (2010). Nature versus nurture in social insect caste differentiation. **Trends in Ecology & Evolution** 25(5): 275-282.
- Silva-Matos, E.V.; Noll, F.B.; Mateus, S. & Zucchi, R. (2006) Non-ovipositing nurse workers with developed ovaries in *Trigona cilipes cilipes* (Hymenoptera, Meliponini). **Brazilian Journal of Morphological Sciences** 23(3-4): 343-347.
- Stefanini, M.; Demartino, C. & Zamboni, L. (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature** 216: 173-174.
- Teixeira, L.V. (2007) Produção de rainhas em colônias de *Plebeia lucii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Teixeira, L.V. (2012) Produção de rainhas em espécies de abelhas sem ferrão com células de cria dispostas em cacho (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Van Benthem, F.D.J.; Imperatriz-Fonseca, V.L. & Velthuis, H.H.W. (1995). Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg): observations and evolutionary implications. **Insectes sociaux** 42(1): 71-87.
- Zucchi, R.; Silva-Matos, E.V.; Nogueira-Ferreira, F.H. & Azevedo, G.G. (1999) On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees, nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Sociobiology** 34: 65-86.