

EYDYELIANA MONTH JURIS

**ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE SENSILAS ANTENAS DE ABELHAS DO
GÊNERO *Tetragonisca* (HYMENOPTERA: MELIPONINI)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

Month Juris, Eydyeliana, 1975-
M789a Análises morfológicas de sensilas antenais de abelhas do
2018 gênero *Tetragonisca* (Hymenoptera: Meliponini) / Eydyeliana
Month Juris. – Viçosa, MG, 2018.
vii, 97 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Tânia Maria Fernandes Salomão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Abelhas sem ferrão. 2. Microscopia eletrônica de
varredura. 3. Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

EYDYELIANA MONTH JURIS


**ANÁLISES MORFOLÓGICAS DE SENSILAS ANTENAIAS DE ABELHAS DO
GÊNERO *Tetragonisca* (HYMENOPTERA: MELIPONINI)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 14 de dezembro de 2018.



José Eduardo Serrão




Riudo de Paiva Ferreira



Khalid Haddi



Gustavo Ferreira Martins



Denilce Meneses Lopes
(Presidente)

Deus
Minha filha Maria Sofia
Meu esposo Juan Manuel
Meus pais Eudes e Cristina
Minhas irmãs Karime e Grey

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em cada momento minha vida.

A minha filha Maria Sofia por todo seu amor e paciência.

A meu esposo Juan Manuel por todo seu carinho e apoio incondicional.

Aos meus pais, Eudes e Cristina, por serem exemplo de vida, integridade, de respeito ao próximo, de perseverança. Pelo apoio incondicional desde Colômbia, por todas as orações.

À Universidade Federal de Viçosa, por me acolher e possibilitar minha formação e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de aprendizado.

À CAPES, pela bolsa concedida por seis meses.

Aos meus orientadores, professora Tânia Fernandes Salamão, professora Denilce Menesses Lopes e professor Gustavo Ferreira Martins, pela orientação e confiança depositada em mim, por estar sempre presente, pelos conselhos e orientações que foram além do conhecimento científico, pelo exemplo de seriedade e profissionalismo.

Ao Coordenador de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, professor José Eduardo Serrão, por toda sua confiança depositada em mim e por todo o aprendizado.

Ao professor Lúcio Campos, pelos ensinamentos e pelo carinho sempre a mim dedicado.

À minha amiga Samira Ravaiano, por tudo que você me ensinou e por todo seu carinho.

À Kallid Haddi e Luís Carlos Martinez, pelas sugestões.

À Raquel e Lara, por serem parte de minha família aqui em Viçosa e por seu carinho pela minha família.

À Renata e Thaís pela disponibilidade em sempre ajudar, principalmente como amigas sempre motivando cada momento de mi instância em Viçosa.

À Beth pela amizade, carinho e ajudarem a me adaptar a Viçosa da melhor maneira possível.

Aos colegas de laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Insetos: Kener, Hugo, Renan, Tales, Raquel, Marcos, Henrique, Carol, Luís Arteaga, Lisbeth, Wagner, Camila, Marina, Natalia, Jaqueline, Alessandra e Priscila.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Características da tribo Meliponini	1
2. Características do gênero <i>Tetragonisca</i>	2
3. Características das sensilas	3
REFERÊNCIAS	6
CAPÍTULO 1	11
ABSTRACT	13
INTRODUCTION	14
MATERIAL AND METHODS	16
1. Samples	16
2. Scanning Electron Microscopy (SEM)	16
3. Analysis of the surface of the antennal flagellum	16
4. Statistical Analysis	17
RESULTS	18
1. Antennal morphology	18
2. Morphological characteristics of sensilla	18
2.1 Sensilla trichodea (ST) subtypes (I to VI)	18
2.2 Sensilla placodea (SP)	19
2.3 Sensilla basiconica (SB)	20
2.4 Sensilla campaniformia (Scp)	20
2.5 Sensilla coeloconica (SCo) and sensilla ampullacea (SA)	20
3. Cluster analysis using Manhattan distance	20
4. Principal components analysis	21
DISCUSSION	22
CONCLUSION	27
ACKNOWLEDGMENTS	28
REFERENCES	29
TABLES	36
FIGURES	39

CAPÍTULO 2	51
RESUMO	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS	56
1. Espécies estudadas	56
2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	56
3. Identificação, distribuição e caracterização dos tipos de sensilas	56
4. Análises morfométricos das sensilas	57
5. Análises estatísticas	60
RESULTADOS	61
1. Estrutura antenal	61
2. Caracterização morfológica das sensilas antenais de <i>T. weyrauchi</i>	61
3. Tipos e distribuição de sensilas antenais em <i>T. angustula</i> , <i>T. fiebrigi</i> e <i>T. weyrauchi</i>	68
4. Diferenças morfométricas das sensilas em <i>T. angustula</i> , <i>T. fiebrigi</i> e <i>T. weyrauchi</i>	72
5. Análise de Componentes Principais (PCA)	76
6. Análise de agrupamento	76
7. Análise discriminante (AD)	77
DISCUSSÃO	86
CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92
CONCLUSÕES GERAIS	97

RESUMO

JURIS, Eydyeliana Month. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2018. **Análises morfológicas de sensilas antenais de abelhas do gênero *Tetragonisca* (Hymenoptera: Meliponini)**. Orientadora: Tânia Maria Fernandes Salomão. Coorientadora: Denilce Meneses Lopes.

As antenas são apêndices móveis encontradas na cabeça dos insetos, constituídas por um escapo, pedicelo e flagelo, as quais funcionam como órgãos dos sentidos, receptores olfativos primários e também com função tátil. Em sua composição possuem estruturas chamadas sensilas, com várias modalidades sensoriais como: olfato, gustação, mecanorrecepção, termorrecepção e higrorrecepção, que desempenham um papel na percepção de estímulos ambientais e na comunicação. As abelhas sem ferrão possuem comportamento complexo, que depende da comunicação entre os indivíduos da colônia e do ambiente. A morfologia externa das sensilas antenais tem sido caracterizada em várias espécies de abelhas eusociais, incluído espécies da tribo Meliponini, porém há pouca informação sobre as sensilas em abelhas do gênero *Tetragonisca*. Com o objetivo de entender a morfologia das sensilas antenais no gênero *Tetragonisca*, foram conduzidas diferentes abordagens de análises morfométricas, mediante a utilização de imagens obtidas com microscopia eletrônica de varredura nas espécies *T. fiebrigi*, *T. angustula* e *T. weyrauchi*. Foram caracterizadas as sensilas antenais entre as castas e sexos de *T. fiebrigi*, sendo identificados onze tipos de sensilas antenais, classificadas como: sensilas tricoides (subtipos I ao VI), placoides, basicônicas, celocônicas, ampuláceas e campaniformes. Com diferenças na distribuição das sensilas entre as classes e castas. As análises morfométricas dos caracteres do comprimento e abundância permitiu verificar que existe diferenciação das sensilas antenais de acordo as funções que desempenham os indivíduos na colônia permitindo a separação entre as classes, castas e a subcasta soldado. Os resultados obtidos para as três espécies analisadas mostram a presença de onze tipos de sensilas entre as espécies, sensilas tricoides (seis subtipos), placóide, basicônica, celocônica, ampulácea e campaniformes, com distribuição conservada ao longo dos flagelômeros. As variações na morfometria das sensilas em *T. angustula* e *T. fiebrigi* são menores do que entre essas e *T. weyrauchi*, não permitindo a separação completa de *T. angustula* e *T. fiebrigi* em todas as análises, sugerindo que as duas espécies compartilham caracteres semelhantes nas sensilas, provavelmente por serem espécies recentemente divergentes.

ABSTRACT

JURIS, Eydyeliana Month. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2018. **Morphological analysis of antennal sensilla of bees in the *Tetragonisca* genus (Hymenoptera: Meliponini)**. Adviser: Tânia Maria Fernandes Salomão. Co-adviser: Denilce Meneses Lopes.

The antennae are movable appendages found in insects heads, consisting of a scape, pedicel and flagellum, which function as sense organs, primary olfactory receptors and also with tactile function. In their composition they have structures called sensilla with various sensorial modalities such as: smell, taste, mechanoreception, thermoreception and hygromoreception, which play a role in the perception of environmental stimuli and in communication. The stingless bees have complex behavior, which depends on the communication between the individuals of the colony and the environment. The external morphology of the antennal sensilla has been characterized in several species of eusocial bees, including species of Meliponini tribe, but there is little information about sensilla in stingless bees of the genus *Tetragonisca*. In order to understand the morphology of the antennal sensilla in the genus *Tetragonisca*, different approaches of morphometric analysis were conducted using images obtained with scanning electron microscopy in the species *T. fiebrigi*, *T. angustula* and *T. weyrauchi*. The antennal sensilla were characterized between the castes and sexes of *T. fiebrigi*, and 11 types of antennal sensilla were identified, classified as: sensilla trichodea (subtypes I to VI), placodea, basiconica, coeloconica, ampullacea and campaniformia, with differences in the distribution of sensilla between classes and castes. The morphometric analysis of the characters of length and abundance allowed to verify that there is differentiation of the antennal sensilla according to the functions that the individuals perform in the colony allowing the separation between the classes, castes and the soldier subcaste. The results obtained for the three species analyzed showed the presence of 11 types of sensilla among the species, sensilla trichodea (six subtypes), placodea, basiconica, coeloconica, ampullacea and campaniformia, with distribution conserved along the flagellomeres. The variations in the morphometry of the sensilla in *T. angustula* and *T. fiebrigi* are smaller than between and *T. weyrauchi*, not allowing complete separation of *T. angustula* and *T. fiebrigi* in all analyzes, suggesting that the two species share similar characters in sensilla, probably because they are recently divergent species.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Características da tribo Meliponini

A tribo Meliponini representa um grande grupo monofilético de abelhas eussociais com distribuição Pantropical (Michener, 2007; Rasmussen & Cameron, 2009), com mais de 500 espécies descritas (Michener, 2007). A tribo possui a maior diversidade comportamental e morfológica entre as abelhas eussociais (Michener, 2007; Camargo & Pedro, 2013), sendo que a maior diversidade está localizada na região Neotropical (Camargo & Pedro, 1992). No território brasileiro estão descritas aproximadamente 300 espécies, distribuídas em vários biomas (Moure *et al.*, 2007, Camargo & Pedro, 2007). Esta pode ser uma subestimativa (Michener, 2007), pois especialistas acreditam que, devido a sua ampla distribuição dentro da região Neotropical, existam mais espécies válidas para este grupo (Pedro, 2014).

Os meliponínios são caracterizados por possuírem o ferrão atrofiado, e por isso, são popularmente conhecidas como “abelhas sem ferrão” (Camargo & Pedro, 2013). Estas são o maior grupo de abelhas altamente eusociais (Michener, 2007). As colônias estão constituídas por rainha, machos e operárias. Todas as rainhas, as operárias e os machos nascem e se desenvolvem até o estágio adulto, dentro de células de cria de igual tamanho (Nogueira-Neto, 1997). As colônias estão constituídas geralmente por uma única rainha, que pode realizar uma postura de até 50 ovos por dia. As operárias podem chegar ao número de 5.000 abelhas em uma colônia forte e realizam todo o trabalho interno e externo (Nogueira-Neto, 1997). A principal função dos machos é de fecundar a rainha na época de procriação e em muitas espécies os machos produzem cera e trabalham com ela, mas em outras espécies também podem desidratar o néctar (Kerr *et al.*, 1996; Nogueira-Neto, 1997).

As abelhas desta tribo constroem seus ninhos principalmente em ocos de árvores, mas algumas espécies nidificam no solo, em formigueiros e em cupinzeiros (ativos ou abandonados). Outra peculiaridade desta tribo é o fato de que suas espécies podem ser identificadas pela arquitetura de entrada de seus ninhos (Michener, 2007).

Essas abelhas constituem um grupo ecologicamente importante, que apresentam uma estreita relação de dependência com as plantas, as quais fornecem o alimento, principalmente pólen e néctar (fontes de proteína e energia, respectivamente) e em troca recebem os benefícios da transferência de pólen (Kevan & Baker, 1983; Proctor *et al.*,

1996) atuando, portanto na manutenção da diversidade das plantas como agentes polinizadores. Acredita-se, que no Brasil cerca de 40 a 90% das árvores nativas são polinizadas por abelhas sem ferrão, dependendo do ecossistema (Kerr, 1996). Assim, a grande necessidade de conservar as espécies de meliponíneos brasileiros reside principalmente, na ampla ação como polinizadores da nossa flora que, por sua vez, garante a presença e desenvolvimento da fauna e de toda biodiversidade (Kerr *et al.*, 1996). Da mesma forma, a conservação da flora nativa também é necessária, uma vez que a fragmentação e degradação dos ambientes naturais podem prejudicar as comunidades de abelhas nativas (Kremen *et al.*, 2002) causando a perda ou a dissociação de recursos importantes para sua alimentação e locais de nidificação (Potts *et al.*, 2005). Algumas dessas espécies tornaram-se importantes sob o ponto de vista econômico, devido a sua atuação na polinização e na produção de mel, cera, própolis, dentre outros.

2. Características do gênero *Tetragonisca*

Dentro da tribo Meliponini encontra-se o gênero *Tetragonisca*, que está composto por quatro espécies descritas: *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938), *Tetragonisca weyrauchi* (Schwarz, 1943) e *Tetragonisca buchwaldi* (Friese, 1925). Estas abelhas estão amplamente distribuídas na América do Sul, desde o México até a Argentina (De Camargo, 2013). Estes insetos são de pequeno porte e possuem coloração amarela, dourada e preta, sendo popularmente conhecidas como Jataí. No Brasil são encontradas três espécies: *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*. A espécie *T. weyrauchi* tem a distribuição mais restrita e é encontrada nos Estados do Mato Grosso, Rondônia e Acre. A espécie *T. fiebrigi* tem distribuição nos Estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, enquanto a espécie *T. angustula* tem distribuição em todo o país (Moure *et al.*, 2007).

As abelhas deste gênero são versáteis, em relação ao local de nidificação, comumente, estas espécies utilizam os mais variados substratos para nidificação e diferentes materiais, incluindo tronco de árvores, blocos de concreto ou cerâmica, muros, alicerces de pedra, caixas metálicas e muitas outras cavidades que apresentem espaço para alojar todo o ninho (Aidar, 1999; Nogueira-Neto, 1997; Cortopassi-Laurino & Nogueira-Neto, 2003). Esta facilidade para ocupação de locais variados, com

diferentes substratos para nidificação, proporcionou às abelhas *Tetragonisca* a adaptação e inclusive a áreas urbanizadas, o que não ocorreu igualmente para a maioria das espécies de abelhas nativas (Aidar, 1997).

A espécie *T. weyrauchi*, possui nidificação diferente das outras espécies do mesmo gênero constrói seus ninhos em forquilhas de galhos de árvores. O ninho é construído inteiramente de cerume, com pequenos furos nas paredes e respiráculo na parte superior, o que permite o controle da ventilação interna e a dissipação de calor. A entrada do ninho está localizada na sua parte inferior e corresponde a um pequeno tubo de três a quatro centímetros de comprimento e de um a dois centímetros de diâmetro, permitindo a passagem de várias abelhas ao mesmo tempo (Cortopassi-Laurino & Nogueira-Neto, 2003).

As abelhas do gênero *Tetragonisca* são altamente eusociais. Costuma-se supor que a divisão do trabalho em todas as espécies da tribo Meliponini é semelhante àquela observada nas abelhas melíferas (Apini) com operárias de tamanho uniforme realizando uma sequência de tarefas à medida que envelhecem (Sakagami, 1982; Quezada-Euán *et al.*, 2011). Porém recentemente foi descoberta um sistema de castas mais complexa em duas espécies do gênero *Tetragonisca* (*T. angustula* e *T. fiebrigi*), devido à presença de um grupo pequeno de guardas de entrada, diferentes as forrageiras das mesmas colônias, permitindo a diferenciação da subcasta dos soldados (Grüter *et al.*, 2017).

Esta subcasta desempenha funções de defesa do ninho, são 30 % mais pesadas que as forrageiras, apresentam corpo, cabeça e as primeiras pernas maiores. Ter soldados maiores é benéfico para as colônias porque o tamanho do corpo está diretamente ligado à capacidade de luta dos guardas destas espécies, o que representa um exemplo de uma adaptação defensiva em abelhas sociais (Grüter *et al.*, 2017).

3. Características das sensilas

As antenas são importantes órgãos sensoriais, envolvidas na detecção de estímulos ambientais e carregam muitos tipos de sensilas, que diferem em estrutura e modalidade sensorial. Essas estruturas são comuns nas antenas e em menor quantidade em outras partes da cabeça como maxilas e palpos labiais (De Bruyne & Baker, 2008), nos tarsos e no aparelho ovipositor (Giannakakis & Fletcher, 1985).

Com base na morfologia, as sensilas são classificadas em diferentes tipos como: sensilas tricoides, basicônicas, placoides, celocônicas, ampuláceas e campaniformes (Keil, 1999; Hallberg *et al.*, 2003).

As sensilas estão envolvidas em uma multiplicidade de modalidades sensoriais, como olfato, gustação, mecanorrecepção, termorrecepção e higrorrecepção (Hansson & Stensmyr, 2011; Schneider, 1964). Cada tipo de sensila desempenha uma ou mais funções. As sensilas placoides estão relacionadas ao olfato (Ochieng *et al.*, 2000); as basicônicas, à quimiorrecepção (Martini & Schmidt, 1984); as sensilas tricoides apresentam função quimio e mecanorreceptora (Ågren & Hallberg, 1996; Mißbach *et al.*, 2011). Sensilas celocônicas e ampuláceas são sensíveis à temperatura e umidade (Al Ghamdi, 2006; Yokohari *et al.*, 1982), enquanto que as campaniformes são termorreceptoras (Yokohari *et al.*, 1982).

As sensilas não estão distribuídas aleatoriamente nas antenas dos insetos (Zacharuk, 1985; Chen, 2003) sendo que seu tipo, abundância e distribuição dependem da necessidade e da diversidade de seu comportamento (Fauchex *et al.*, 2006). Sua distribuição pode ser um reflexo das pressões de seleção sofridas pelas espécies. Dessa forma, o sexo, a casta, hábitos alimentares e locais que elas habitam são importantes para a determinação dessa distribuição (Chapman, 1982; Chen, 2003).

Nos Hymenoptera as diferenças entre os tipos e números de sensilas estão presentes em cada grupo e variam de acordo com as espécies. Nas formigas *Solenopsis invicta* foram encontrados seis tipos (Renthal *et al.*, 2003), em *Camponotus japonicus*, oito (Nakanishi *et al.*, 2009), *Apis mellifera* possui oito tipos de sensilas (Frasnelli *et al.*, 2010) enquanto *Melipona scutellaris* possui sete (Nascimento *et al.* 2013; Carvalho *et al.*, 2017), em *M. interrupta*, *M. seminigra* e *M. quadrifasciata* foram encontrados até treze tipos (Ravaiano *et al.*, 2014; Campos, 2016).

Variações na quantidade e tipo de sensilas antenais podem ser usadas para diferenciação interespecífica de insetos. Por exemplo, operárias de *Scaptotrigona postica* possuem um menor número de sensilas placoides, ampuláceas e campaniformes que operárias de *A. mellifera* (Stort & Moraes-Alves, 1998). Essa diferenciação também pode ser vista entre subespécies de uma mesma espécie, como em machos de diferentes subespécies de *Apis africana* (*A. mellifera scutellata*), italiana (*A. mellifera ligustica*) e africanizada (*A. mellifera mellifera*), que possuem números diferentes de sensilas campaniformes, ampuláceas e celocônicas (Stort & Moraes-Alves, 1999).

Nos insetos sociais, as diferenças entre os tipos, abundância e distribuição das sensilas também estão associados à casta e ao sexo. Em formigas investigações morfológicas e fisiológicas mostraram que existe uma forte correlação entre os padrões de sensilas das antenas e as tarefas realizadas pelas diferentes castas da colônia (Sheridan, 1996; Ozaki *et al.*, 2005; Mysore *et al.*, 2010). Os machos de *A. mellifera*, por exemplo, possuem maior número de sensilas placoides do que as operárias. Essa diferença pode ser justificada pelo fato de o macho utilizar essa estrutura na procura pela rainha (Stort & Moraes-Alves, 1999). Nas formigas *C. japonicus*, as rainhas têm mais sensilas nas antenas que as operárias (Nakanishi *et al.*, 2009). Em várias espécies de abelhas sem ferrão foram encontradas diferenças morfométricas das sensilas em castas e sexos de *M. quadrifasciata* (Ravaiano *et al.*, 2014) *M. scutellaris* (Carvalho *et al.*, 2017), *M. interrupta* e *M. seminigra* (Campos, 2016). No gênero *Tetragonisca*, somente a espécie *T. angustula*, apresenta a descrição dos tipos de sensilas (Fialho *et al.*, 2014), porém não se conhece os tipos de sensilas para as outras espécies deste gênero e se existem diferenças entre os tipos de sensilas.

Nesse contexto, considerando a importância do estudo das sensilas para elucidar as questões relacionadas com as diferenças morfológicas das espécies do gênero *Tetragonisca*, neste estudo tivemos como objetivo geral examinar a morfologia das sensilas antenais, assim como estabelecer quais são as características nos tipos, distribuição e morfometria das sensilas antenais das três espécies do gênero *Tetragonisca*, visto que existem poucos estudos sobre as sensilas deste gênero. No primeiro capítulo do presente trabalho, foram realizadas umas análises da morfologia, número e distribuição das sensilas na espécie *T. fiebrigi*, para entender melhor a distribuição destas estruturas nas antenas de indivíduos de diferentes sexos, castas e subcastas desta espécie. Estas análises auxiliam na compreensão das relações dessas estruturas com o comportamento das abelhas no meio ambiente, seus mecanismos de comunicação, e informações sobre como os recursos ambientais podem ser percebidos. No segundo capítulo foram caracterizados os tipos e distribuição das sensilas presentes em *T. weyrauchi* e foram estimadas as diferenças morfométricas entre as sensilas antenais das três espécies deste gênero (*T. fiebrigi*, *T. angustula* e *T. weyrauchi*). Esta última abordagem foi realizada com o propósito de analisar o grau de variabilidade das sensilas e fornecer informação sobre a taxonomia e relação entre as espécies.

REFERÊNCIAS

- Ågren, L. & Hallberg, E. (1996). Flagellar sensilla of bumble bee males (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*). *Apidologie*. **27**, 433–444.
- Aidar, D.S. (1997). Meliponicultura e ecossistema: Preservação, formação de colônias, manejo e alimentação de meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: Ann. Simpósio Paranaense de Apicultura. Guarapuava. **12**, 49–55.
- Aidar, D.S. (1999). Coleta de ninhos de Jataí (*Tetragonisca angustula*). Paracatu: Fundação Acangau, p.32.
- Al Ghamdi, A.A. (2006). Scanning electron microscopic studies on antennal sensilla organs of adult honey bee workers in genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Bulleting Entomological Society Egypt*. **83**, 1–11.
- Camargo, J.M.F. & de Menezes Pedro, S.R. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*. **23**, 509–522.
- Camargo, J.M.F. & Pedro S.R.M. (2007). *Meliponini Lepeletier*, 1836, p. 272–578. In: J.S. Moure, D. Urban & G.A.R. Melo (Orgs.). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, p.1058.
- Camargo, J.M.F. & Pedro, S.R.M. (2013). *Meliponini Lepeletier*, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region-online version*. Available at <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Mai/18/2019.
- Campos, D.D. (2016). Análise morfológica das sensilas antenais das abelhas *Melipona interrupta* Latreille, 1811 e *Melipona seminigra* Friese, 1903.
- Carvalho, W.J., Fujimura, P.T., Bonetti, A.M., Goulart, L.R., Cloonan, K., da Silva, N.M., Araújo, E.C.B., Ueira-Vieira, C. & Leal, W.S. (2017). Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of *Melipona scutellaris* stingless bee. *PLoS One*. **12**, e0174857.
- Chapman, R. F. (1982). Chemoreception: The significance of receptor numbers. *Advances in insect physiology*. **16**, 247–356.
- Chen, H.H., Zhao, Y.X. & Kang, L. (2003). Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits. *Journal of Biosciences*. **28**, 743–752.

- Cortopassi-Laurino, M. & Nogueira-Neto, P. (2003). Notes on the bionomy of the stingless bee *Tetragonisca weyrauchi* Schwarz, 1943 (Apidae, Meliponini). *Acta Amazonica*. **33**, 643–650.
- De Bruyne, M. & Baker, T.C. (2008). Odor detection in insects: volatile codes. *Journal of Chemical Ecology*. **34**, 882–897.
- De Camargo, J.M.F. (2013). Historical Biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) of the Neotropical Region. In: Vit, P., Pedro S.R.M., Roubik D. (Eds.). *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*. New York, NY: Springer New York, p.19–34.
- Faucheux, M.J., Kristensen, N.P. & Yen, S.H. (2006). The antennae of neopseustida moths: Morphology and phylogenetic implications, with special reference to the sensilla (Insecta, Lepidoptera, Neopseustidae). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*. **245**, 131–142.
- Fialho M.C.Q., Guss-Matiello C.P., Zanuncio J.C., Campos L.A.O. & Serrão J.E. (2014). A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. *Journal of Apicultural Research*. **53**, 392–403.
- Frasnelli E., Anfora G., Trona F., Tessarolo F. & Vallortigara G. (2010) Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavior Brain Research*. **209**, 221–225.
- Giannakakis A. & Fletcher B.S. (1985). Morphology and distribution of antennal sensilla of *Dacus tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). *Australian Journal of Entomology*. **24**, 31-35.
- Grüter C., Segers F. H., Menezes C., Vollet-Neto A., Falcón T., von Zuben L. & Almeida E. A. (2017). Repeated evolution of soldier sub-castes suggests parasitism drives social complexity in stingless bees. *Nature Communications*. **8**, 4.
- Hallberg, E., Hansson B.S. & Löfstedt, C. (2003) Sensilla and proprioceptors. In: Kristensen NP (ed.), *Lepidoptera, Moths and Butterflies: morphology, physiology and development*, vol 2. WdG, New York, Berlin, p. 267–288.
- Hansson, B.S. & Stensmyr, M.C. (2011). Evolution of insect olfaction. *Neuron*. **72**, 698–711.
- Keil, T.A. (1997). Comparative morphogenesis of sensilla: a review. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. **26**, 151–160.

- Keil, T. A. (1999). Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In *Insect olfaction*. 5–47. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kerr, W.E., Carvalho, G.A. & Nascimento, V.A. (1996). *Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação* (Vol. 2). Fundação Acangaú.
- Kevan, P.G. & Baker, H.G. (1983). Insects as flower visitors and pollinators. *Annual review of entomology*. **28**, 407-453.
- Kremen, C., Williams, N.M. & Thorp, R.W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**, 16812-16816.
- Martini, R. & Schmidt, K. (1984). Ultrastructure and early development of the pore plate sensilla of *Gymnomerus laevipes* (Shuckard) (Vespoidea, Eumenidae). *Protoplasma*. **119**, 197–211.
- Mißbach C., Harzsch S. & Hansson B.S. (2011). New insights into an ancient insect nose: the olfactory pathway of *Lepismachilis y-signata* (Archaeognatha: Machilidae). *Arthropod Structure & Development*. **40**, 317–333.
- Michener, C.D. (2007). *The bees of the world*. 2nd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Moure J.S.; Melo G.A.R. & Faria J.R.R.R. (2007). *Euglossini Latreille, 1802*. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, p.214–255.
- Mysore, K., Shyamala, B.V. & Rodrigues, V. (2010). Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus compressus* (Fabricius, 1787). *Arthropod structure & development*. **39**, 310–321.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F. & Nishikawa, M. (2009). Sex specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell and Tissue Research*. **338**, 79–97.
- Nascimento, M.A., Salomão, T.M.F. & Martins, G. (2013). Estudo comparativo das sensilas antenais de operárias de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes. *EntomoBrasilis*. **6**, 64–67.
- Nogueira-Neto, P. (1997). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo: Editora Nogueirapis, p.446.

- Ochieng, S.A., Park, K.C., Zhu, J.W. & Baker, T.C. (2000). Functional morphology of antennal chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Arthropod Structure and Development*. **29**, 231–240.
- Ozaki, M., Wada-Katsumata, A., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nisimura, T. & Yamaoka, R. (2005). Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*. **309**, 311–314.
- Pedro, S.R. (2014). The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*. **61**, 348–354.
- Potts, S.G., Vulliamy, B., Roberts, S., O'Toole, C., Dafni, A., Ne'eman, G. & Willmer, P. (2005). Role of nesting resources in organising diverse bee communities in a Mediterranean landscape. *Ecological Entomology*. **30**, 78–85.
- Proctor, M., Yeo, P. & Lack, A. (1996). *The natural history of pollination*. Harper Collins Publishers. London, p.479.
- Quezada-Euán, J.J.G., López-Velasco, A., Pérez-Balam, J., Moo-Valle, H., Velazquez-Madrado, A. & Paxton, R.J. (2011). Body size differs in workers produced across time and is associated with variation in the quantity and composition of larval food in *Nannotrigona perilampoides* (Hymenoptera, Meliponini). *Insectes sociaux*. **58**, 31–38.
- Rasmussen, C. & Cameron, S.A. (2009). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*. **99**, 206–232.
- Ravaiano, S.V., de Paiva Ferreira, R., de Oliveira Campos, L.A. & Martins, G.F. (2014). The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. *Naturwissenschaften*. **101**, 603–611.
- Renthal, R., Velazquez, D., Olmos, D., Hampton, J. & Wergin, W.P. (2003). Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*. **34**, 405–413.
- Sakagami, S. F. (1982). Stingless bees. In: *Social Insects*. Vol. III. (Ed. H. Hermann.), p.361– 423. New york: Academic Press.
- Sheridan, S.L., Iversen, K.A. & Itagaki, H. (1996). The role of chemical senses in seed-carrying behavior by ants: A behavioral, physiological, and morphological study. *Journal of insect physiology*. **42**, 149–159.

- Stort, A.C. & Moraes-Alves, M.M.B. (1998). Study of the Sensory Structures of the Antennae of *Scaptotrigona postica* Workers (Hymenoptera-Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*. **58**, 163–167.
- Stort, A.C. & Moraes-Alves, M.M.B. (1999). Differences in the number of antennal Sensory structures of males of three honey bee types. *Revista Brasileira de Biologia*. **59**, 161–166.
- Yokohari F., Tominaga Y. & Tateda H. (1982). Antennal hygrometers of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Cell and tissue research*. **226**, 63–73.
- Zacharuk, R.Y. (1985). Antennae and sensilla. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. **6**, 1–69.

CAPÍTULO 1

Artigo submetido no periódico Journal of Zoology.

Morphological assessment of the sensilla of the antennal flagellomeres in different castes of the stingless bee *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)

Short title: Antennal sensilla of a stingless bee

Eydyeliana Month Juris¹; Samira Veiga Ravaiano², Denilce Meneses Lopes¹, Tânia Fernandes Salomão¹, Gustavo Ferreira Martins¹.

1. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, 36570-000, Minas Gerais, Brasil.

2. Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Centro, Viçosa, 36570-000, Minas Gerais, Brasil.

Correspondence to:

Gustavo Ferreira Martins

Departamento de Biologia Geral

Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Viçosa, MG 36570-900

Brazil

Tel. (+55) (31) 3612-5008

E-mail: gmartins@ufv.br

ABSTRACT

The antenna of the insects have cuticular structures called sensilla that play a pivotal role in the perception of stimuli and in communication. The morphology of antennal sensilla has been characterized in eusocial bees; however, there is little information on bees of the genus *Tetragonisca*. Using scanning electron microscopy, 11 types of antennal sensilla were identified in *Tetragonisca fiebrigi*: trichodea (ST, subtypes I-VI), placodea, basiconica, coeloconica, ampullacea, and campaniformia. The largest diversity of sensilla was observed in females. The STI was the most abundant, followed by the placodea and the STII. The STI and the sensilla placodea were more abundant in males than females, while the STII were more abundant in workers. Significant differences were found in the length of the different types of sensilla among the classes of individuals, with these differences being greater for the STI in males and the STV in queen; for the STII, STIII, and STIV in queen and workers; and for sensilla placodea in queens, workers, and soldiers. Multivariate analysis (PCA and UPGMA) showed that the soldier subcaste was separated from the other females. This study advanced our understanding of sensilla morphology, including the number and distribution of sensilla across sexes and castes, and of the sensory structures of *T. fiebrigi*. The results presented provide relevant information for elucidating the communication mechanisms of social insects.

INTRODUCTION

The antennae of insects are vital sensory organs, which carry a variety of cuticular structures called sensilla that differ in morphology and sensorial modality. Sensilla are common in the antennae and different parts of the body, such as maxillary and labial palps (De Bruyne & Baker, 2008), tarsus, and ovipositor apparatus (Giannakakis & Fletcher, 1985). The type, abundance, and distribution of sensilla depend on the species, behavior, chemosensory needs (Fernandes, Pimenta & Linardi, 2004; Fauchex *et al.*, 2006) and geographic occurrence of individuals, possibly due to the phenotypic plasticity, important to response to environmental changes (Esteban *et al.*, 2005; Euzébio, Martins & Fernandes-Salomão, 2013; Elgar *et al.*, 2018).

Sensilla are involved in the detection of chemical, mechanical, and thermal stimuli (Schneider, 1964; Hansson & Stensmyr, 2011). Based on their morphology and function, sensilla are classified into different morphological types, e.g., trichodea, basiconica, chaetica, coeloconica, placodea, ampullacea, campaniformia (Keil, 1999; Nation, 2002). The trichodea, basiconica, and placodea sensilla are associated with the reception of pheromones and other semiochemicals (Keil, 1997). The sensilla basiconica are also associated with the perception of cuticle hydrocarbons (Getz & Akers, 1993). The trichodea sensilla might also have mechanoreceptor functions (Ågren & Hallberg, 1996; Mißbach, Harzsch & Hansson, 2011). Sensilla coeloconica and ampullacea are sensitive to temperature and humidity (Yokohari, Tominaga & Tateda, 1982; Al Ghamdi, 2006), whereas sensilla campaniformia are thermoreceptors (Dietz & Humphreys, 1971; Yokohari, 1983).

In social insects, the diversity of antennal sensilla varied according to species. For example, in the ants *Solenopsis invicta* (Renthal *et al.*, 2003) and *Camponotus japonicus* (Nakanishi *et al.*, 2009) there are five and eight different types of sensilla, respectively. In the bees *Apis mellifera* (Frasnelli *et al.*, 2010), *Melipona quadrifasciata* (Ravaiano *et al.*, 2014) and *Melipona scutellaris* (Nascimento *et al.*, 2013) there are six, thirteen and seven different types of sensilla, respectively. Within the same species, differences in terms of types and distribution of sensilla also may be related to caste and sex or different tasks individuals perform in the colony (Sheridan, Iversen & Itagaki, 1996; Mysore, Shyamala & Rodrigues, 2010; Ravaiano *et al.*, 2014; Wittwer & Elgar, 2018). For instance, males of *A. mellifera* have a higher number of sensilla placodea than workers, allowing them to locate the queen (Esslen & Kaissling, 1976; Stort &

Moraes-Alves, 1999). More recently, studies found differences in the type and number of sensilla among castes and sexes of several species of stingless bees, including the genus *Melipona* (Nascimento *et al.*, 2013; Ravaiano *et al.*, 2014; Campos, 2016; Carvalho *et al.*, 2017).

Stingless bees (Apidae; Meliponini) are highly eusocial insects that pollinate wild and cultivated plants in tropical and subtropical regions. These bees exhibit complex behaviors that depend on the communication among individuals of the colony. In this context, chemical communication is essential for the functioning and maintenance of the colony, caste transition, defense, and mating (Monnin, 2006; Denison & Raymond-Delpech, 2008). Products of exocrine glands (including volatile and non-volatile pheromones) of bees play a role in this communication (Engels *et al.*, 1993; Katzav-Gozansky *et al.*, 2001; Monnin, 2006). These products or pheromones are recognized by antennal sensilla (Nation, 2002).

Considering the sensilla in stingless bees, the most well-known species are *M. quadrifasciata* (De Moraes & Cruz-Landim, 1972; Ravaiano *et al.*, 2014), *M. scutellaris* (Nascimento *et al.*, 2013; de Carvalho *et al.*, 2017) and *Scaptotrigona postica* (Stort & Barelli, 1981). There are few studies on the sensilla of *Tetragonisca*; however, among the species of this genus, *Tetragonisca angustula* is the most studied (Fialho *et al.*, 2014; Dohanik *et al.*, 2016). In the present work, the distribution and types of sensilla were compared among different sexes and castes of *Tetragonisca fiebrigi* by scanning electron microscopy (SEM). *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) has a complex caste system, consisting of caste and subcastes, divided into workers, queens, and soldiers (Silveira, Melo & Almeida, 2002; Michener, 2007; Grüter *et al.*, 2017). The results provide an overview of the types, size, and a number of sensilla in the antennae of this species and are complementary for further physiological and behavioral studies on *T. fiebrigi* and other *Tetragonisca* species, and will be useful for the future study of taxonomic and phylogenetic analysis of the genus.

MATERIAL AND METHODS

1. Samples

The analyses were made with twenty-two *T. fiebrigi* individuals including fourteen workers, four males, two soldiers, and two queens sampled from different colonies collected from different localities and preserved in 96% ethanol.

2. Scanning electron microscopy (SEM)

The right antennae were dehydrated in a graded ethanol series (50–100%) and transferred to Hexamethyldisilazane (HMDS). The antennae were mounted on aluminum stubs and coated with gold powder. Samples were analyzed using the scanning electron microscopy (SEM) (LEO VP1430) at the Núcleo de Microscopia e Microanálises at UFV (NMM/UFV).

3. Analysis of the surface of the antennal flagellum

The sensilla from the dorsal surface of the antennal flagellum were classified according to previously described morphological criteria (Marques-Silva *et al.*, 2006; Nakanishi *et al.*, 2009; Frasnelli *et al.*, 2010; Ravaiano *et al.*, 2014) and counted in a fixed-size area of 230 × 230 pixels for flagellomere using the Adobe Photoshop 7.0 program. The sensilla trichodea type V and VI were only present at the tip of the last flagellomere. Sensilla length was measured using the Image ProPlus 4.5 program (Ravaiano *et al.*, 2014). We choose studying the dorsal surface of the antenna of *T. fiebrigi* because, as previously reported for other bees, sensilla are in higher numbers and diversity in the dorsal surface of antennae (Ravaiano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017; Gonzalez-Vaquero & Galvani, 2016; Galvani *et al.*, 2017). In our case, there were fewer sensilla (two types of both sensilla trichodea and sensilla placodea) in the ventral surface of the antenna in comparison to the dorsal surface, and only one subtype of sensilla trichodea in the pedicel of all classes of individuals of *T. fiebrigi* (Supporting information).

4. Statistical analysis

Data of the length (μm) and a number of sensilla for each of the antennal flagellomeres and class of individuals were considered for the statistical analyses. Descriptive statistics were performed using the program jamovi v. 0.9 (Jamovi project, 2018). As the data did not show a normal distribution by the Shapiro-Wilk test, non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis, and the Dwass-Steel-Critchlow-Fligner comparison tests were performed using the program jamovi project v. 0.9 (Jamovi project, 2018). The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

The boxplots graphs generated with the software JASP v 0.8.5.1. were made using the median (Team, 2018). To determine the separation of castes due to sensilla, the morphometric data were analyzed by a principal components analysis (PCA) and cluster analysis method (UPGMA), using Manhattan distance matrices for dissimilarity measurements and the software PAST (Hammer, Harper & Rian, 2016) for the estimations.

RESULTS

1. Antennal morphology

The antennae of *T. fiebrigi* were of the geniculate type, composed of the scape, pedicel, and flagellum, and subdivided into flagellomeres (Fig. 1). The number of flagellomeres varied with sex, with females having 10 flagellomeres (Fig. 1A) and males having 11 (Fig. 1B).

2. Morphological characteristics of sensilla

Based on the morphological characteristics, eleven types of sensilla were identified on the dorsal surface of antennal flagellum of *T. fiebrigi* females (i.e., workers, soldiers, and queens): sensilla trichodea (ST), subtypes I to VI, placodea (SP), basiconica (SB), campaniformia (SCp), coeloconica (SCo), and ampullacea (SA). In males, only eight types of sensilla were present: ST of subtypes I to VI, SP and SCp. The greatest diversity in sensilla was observed in the last the distal end of the flagella for both sexes, in the last flagellomere of both females (F10) and males (F11) (Table 1).

2.1 Sensilla trichodea (ST) subtypes (I to VI)

This sensillum were inserted into small circular depressions and were present in all flagellomeres (F). Due to morphological variations, ST were divided into six different subtypes (I to VI) that were present in all classes of individuals (Figs. 2B-D, 3A-C, 4A-C), and no pores were seen on their surface under high magnificence of SEM (Figs. 5A-F, 6D).

The ST I were shaped like a lance and inclined towards the tip of the antenna, and they were the most abundant sensilla with uniform distribution in the flagellomeres (Figs. 2D, 3A, 4B, 5A, 6D), except F1, where they are not observed. This subtype of sensilla was more abundant in males, followed by queens and workers. The lowest number of STI was found in the soldiers (Table 2, Fig. 7). The length of STI was greater in males, followed by queens and workers ($p < 0.05$). Shorter STI were present in soldiers (Table 3, Fig. 8).

STII were similar to STI with respect to the inclined base; however, STII were thinner than STI (Figs. 2D, 3A, 4B, 5B, 6D). STII were the second most abundant subtype of sensilla among ST and the third most abundant when compared to other types. They were present from the second to the last flagellomere. There were more STII present in workers, queens, and soldiers than in males ($p < 0.05$, Table 2, Fig. 7). This sensilla was longer in queens ($p < 0.05$) and shorter in males and soldiers (Table 3, Fig. 8).

STIII were flattened laterally (sickle-shaped) and were exclusively found in the latter half of F1 (Fig. 2B, 4A, 5C). There were no differences in the number of STIII among the different classes of individuals ($\chi^2 = 0,057$, $df = 3$, $p > 0.05$) (Table 2). However, STIII were longer in queens, followed by workers ($p < 0.05$), and were shortest in males and soldiers (Table 3, Fig. 8).

STIV were straight, tilted to the tip of the antenna with the presence of longitudinal grooves, and were only present in F1 (Figs. 2B, 3B, 4A, 5D). There were no differences in the number of STIV among the different classes of individuals ($\chi^2 = 0.056$, $df = 3$, $p > 0.05$) (Table 2). However, the longest STIV were found in the queens, followed by the workers ($p < 0.05$) (Table 3, Fig. 8). The shortest STIV were present in males and soldiers (Table 3, Fig. 8).

STV were found in the last flagellomere of all classes of individuals. The base of STV was perpendicular to the antennal cuticle, and the tip was tilted (Figs. 2C, 3C, 4C, 5E). There were no significant differences in the number of STV among individuals ($\chi^2 = 0.089$, $df = 3$, $p > 0.05$) (Table 2). However, STV were longer in queens ($p < 0.05$), and were of similar length in males, workers, and soldiers ($p > 0.05$) (Table 3, Fig. 8).

STVI were straight, perpendicular to the antennal cuticle, and were found in the last flagellomere of females and males (Figs. 2C, 3C, 4C, 5E). The number of STVI was similar among the different classes of individuals ($\chi^2 = 0.044$, $df = 3$, $p > 0.05$) (Table 2). The largest STVI were found in queens, with the number of STVI differing ($p < 0.05$) among males, workers, and soldiers, which had the smallest STVI (Table 3, Fig. 8).

2.2 Sensilla placodea (SP)

SP were flat discs that were surrounded by a groove and had a slight depression in the center. They were found in all flagellomeres, except F1 (Figs. 2D, 3A, 4A, 4B,

5F, 6C). SP were the second most abundant type of sensilla in the *T. fiebrigi* antennae, being twice as abundant in males as in females (Table 2, Fig. 7). Among females, the highest number of SP were present in workers ($p < 0.05$) (Table 2, Fig. 7). In contrast, longest SP was found in females compared to males ($p < 0.05$) (Table 3, Fig. 7).

2.3 Sensilla basiconica (SB)

SB were thick and straight (Figs. 2D, 3C, 5F, 6B). They were found exclusively in females F10 (Table 1). The numbers of SB were similar among the classes of females ($p > 0.05$) (Table 2). SB were longer in queens and differed from workers and soldiers in length ($p < 0.05$) (Table 3, Fig. 7).

2.4 Sensilla campaniformia (Scp)

SCp were round bell-shaped, with a prominent cuticle and a depression at the edges (Figs. 2C, 3C, 4C, 5E, 6A). SCp were only found in the last flagellomere of females (F 10) and males (F 11). The numbers of SCp were similar among the all classes of individuals ($p > 0.05$) (Table 2), and they were longer in females than males ($p < 0.05$) (Table 3, Fig. 7).

2.5 Sensilla coeloconica (SCo) and sensilla ampullacea (SA)

SCo and SA were very similar to each other, being small, slightly rounded, and formed from the cavities of the cuticle, these sensilla were only present in small numbers at the distal end of females F10, (Figs. 2C, 3C, 6D). The numbers of SCo and SA were similar among the all classes of individuals ($p > 0.05$) (Table 2). SCo were larger than SA. SCo were larger in diameter in queens and soldiers, differing from workers ($p < 0.05$). In comparison, SA had a similar diameter among females ($p > 0.05$) (Table 3).

3. Cluster analysis using Manhattan distance

The UPGMA cluster analysis using the Manhattan distance produced a high Cophenetic Correlation Coefficient (0.966), with individuals being separated into four

groups: workers, soldiers, queens, and males (Fig. 9). Among females, workers and soldiers were more similar to a distance of 28, followed by queens joining at a distance of 52. The males were the most different because they had the greatest dissimilarity distance about females.

4. Principal components analysis

The first three principal components explained 92.96% of the morphological variation of the sensillum (component 1: 64.62%, component 2: 19.06%, and component 3: 9.28%). The first component represented the variability of the sensillum due to sex, separating males from females. The second component explained the separation between queens and workers. The third component explained the separation between queens and workers from soldiers (Figs. 10A-C).

The loading plots for the three principal components showed that the sensilla with greater contribution to variability for the first component in terms of number were STI, STII, and SP and in terms of length were STI, SP, and SB (Fig. 11A). The sensilla with greater contribution to variability for the second component in terms of number were STI, STII, STIII, STV, and STVI and in terms of length were STIII, STIV, STV, and STVI (Fig. 11B). Finally, the sensilla with greater contribution to variability for the third component in terms of number were STI and STII and in terms of length were STIV, STVI, and SB (Fig. 11C).

DISCUSSION

This study provided a comparative analysis of the morphology and distribution of the sensilla of the dorsal surface of the antennal flagellomeres of *T. fiebrigi*. We found that the different types of sensilla exhibited considerable morphometric variation that allows differentiating among castes, subcastes, and sexes. The antennal organization of *T. fiebrigi* is similar to the antennae of other eusocial hymenopterans including bees, with the antenna subdivided in scape, pedicel, and flagellum. The antenna is composed of 10 flagellomeres in females and 11 flagellomeres in males (Esslen & Kaissling, 1976; Marques-Silva *et al.*, 2006; Nakanishi *et al.*, 2009; Euzébio *et al.* 2013; Ravaiano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017). This variation between males and females was also observed in terms of the number of sensilla on the flagellum of *T. fiebrigi*, as reported for *M. quadrifasciata* and *M. scutellaris* (Ravaiano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017).

The different types of sensilla found in the flagellomeres antennae of *T. fiebrigi* is also present in the same antennal portion of other bees, such as *A. mellifera* (Frasnelli *et al.*, 2010), *T. angustula* (Fialho *et al.*, 2014), *M. quadrifasciata* (Ravaiano *et al.*, 2014), *M. scutellaris* (Carvalho *et al.*, 2017), *Melipona interrupta*, *Melipona seminigra* (Campos, 2016) and several ants species (Renthal *et al.*, 2003; Nakanishi *et al.*, 2009). These types of sensilla are conserved among social Hymenoptera. However, the distribution pattern of the SCo, SA, SCp, and SB is different in *T. fiebrigi* in comparison to the above mentioned species because these sensilla are only present in the distal flagellomere of the antenna unlike the other species, where these sensilla are distributed found in other flagellomeres. The implications of this difference in sensilla distribution in the stingless bee behavior is something to be explored in future works.

The high diversity of sensilla observed at the antenna tip of the females and males (F10 and F11, respectively) of *T. fiebrigi* is in accordance with the study of the antenna of *Melipona* species that have a similar sensilla diversity in this region (Ravaiano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017). This high diversity of sensilla could allow a better recognition of specific olfactory stimuli, such as pheromones due to the presence of a greater number of sensilla with chemoreceptor function, such as SB, SP, and ST (Keil, 1997; Chen, Zhao & Kang, 2003; Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). This diversity may favor communication between individuals inside the colony, particularly during the processes of provisioning and oviposition (POP) (Sakagami &

Oniki, 1963). The presence of SCo, SA, and SCp only at the tip of the antenna could favor a greater perception of external stimuli since this area is the most exposed (Silva *et al.*, 2010). It has been shown that these sensilla are involved in the detection of humidity, temperature, and CO₂ in beetles and dragonflies (Must *et al.*, 2006; Reborá *et al.*, 2007).

Similarly to other species of *Melipona*, the ST are polymorphic and are the most abundant type of sensillum found in dorsal surface of the flagellum of *T. fiebrigi* (Ravaiano *et al.*, 2014; Campos, 2016). In general, chemoreceptor functions for the perception of pheromones and volatile semiochemicals have been attributed to these types of sensilla (Keil, 1997; Ma & Du, 2000). Among the sensillum subtypes, STI are larger and more abundant in males than in females of *T. fiebrigi*. Several studies have shown that olfactory sensory neurons (OSNs) that detect sex pheromones are located in the long trichodea of males (Hansson *et al.*, 1995; Ebbinghaus *et al.*, 1997), suggesting a chemoreceptor function for ST necessary for mating, social recognition, and foraging (Zacharuk, 1985; Shanbhag, Müller & Steinbrecht, 1999). In addition, males of the Meliponini species also forage for short periods immediately after leaving the colony (Velthuis, Koedam & Imperatriz-Fonseca, 2005), which might explain the increased number of STI in *T. fiebrigi* males. As well as, STI in *T. fiebrigi* are larger in males than in females, which might corroborate the supposed olfactory capacity of drones of Meliponini to the detect mating pheromones (Engels *et al.*, 1997; Fierro *et al.*, 2011; Verdugo-Dardon *et al.*, 2011).

The STII was the second most abundant and the shortest sensillum subtype across the dorsal surface of the flagellum of *T. fiebrigi*, being more abundant and longer in workers and queens in comparison to males. This pattern is similar for males and females of *M. quadrifasciata* and *M. scutellaris*, that presented the sensilla trichodea (STII) (Ravaiano *et al.*, 2014) and the sensilla trichodea (Tb) (Carvalho *et al.*, (2017). Some bees of the Tribe Emphorini had similar sensilla to STII, named trichodea B (STB), a non-porous sensilla (Galvani *et al.*, 2012). Assuming that STII can act as both olfactory and mechanoreceptors, it could be speculated that the higher abundance and length of STII in females might be related to the detection of allowing for the recognition of individuals within a colony (Onagbola *et al.*, 2009; Wenninger *et al.*, 2009).

The number of STIII, STIV, STV, and STVI did not differ among the different classes of *T. fiebrigi*. However, they are different in length. The sensillum STIII, STIV,

and STV were the longest in queens and workers. Maybe these sensilla might enhance the olfactory capacity of these two females. Long ST in the antenna of *S. littoralis* responded to the components of the sexual pheromone produced by the female (Page & Peng, 2001; Binyameen *et al.*, 2012).

The SP was the second most abundant sensilla, being almost twice as abundant in males as compared to females, similar to that reported for other eusocial bees (Stort & Moraes-Alves, 1999; Ravaiano *et al.*, 2014) and bees of the tribe Emphorini (Galvani *et al.*, 2012). These sensilla are described as being olfactory in some Hymenoptera (Ochieng *et al.*, 2000; Al Ghamdi, 2006; Spaethe *et al.*, 2007). For example, in *Bombus terrestris*, higher amounts of SP are associated with greater olfactory acuity (Spaethe *et al.*, 2007). A higher number of SP in *T. fiebrigi* males, as observed in the present study, would facilitate the detection of female pheromones (Stort & Moraes-Alves, 1999; Ochieng *et al.*, 2000). Among *T. fiebrigi* females, the workers presented a high number of SP, which might improve olfaction in these individuals. SP length was greater in *T. fiebrigi* females than in the males, as described in other eusocial bees Cruz-Landim (2009).

The SB was exclusive to *T. fiebrigi* females, similarly to other species from the tribe Meliponini. On the other hand, these sensilla were only present at the tip of F10 and not in all the F10 as in the other species of the same tribe (Fialho *et al.*, 2014; Ravaiano *et al.*, 2014; Campos, 2016; Carvalho *et al.*, 2017). Similar numbers of SB were found among the female castes of *T. fiebrigi*. However, the main difference was related to their length, being longer in queens than for soldiers and workers. Olfactory functions were attributed to SB, which was involved in the detection of pheromones and volatile semiochemicals (Keil, 1997). In ants, these sensilla are sensible to cuticular hydrocarbons, allowing for the recognition of individuals within the colony (Ozaki *et al.*, 2005; Nakanishi *et al.*, 2009), therefore, we speculate that in Meliponini SB could perform the same function.

The distribution of SCp was restricted to F10 or F11 in all classes of individuals of *T. fiebrigi*. This limited distribution is conserved in other Meliponini, including species of the genus *Melipona* (Ravaiano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017). SCp are considered as thermoreceptors, hygrometers, and CO₂ detectors (Dietz & Humphreys, 1971). However, only the thermoreception function was confirmed for *A. mellifera* (Must *et al.*, 2006). Although the function of the SCp has not yet been

reported for *T. fiebrigi*, it is possible that they act as thermoreceptors in females, due to the longer length and its presence at the antennal tip.

SA and SCo were sparse and were found close to each other in the F10 of the dorsolateral region of females of *T. fiebrigi*, as described for *M. quadrifasciata* (Ravaiano et al., 2014). These sensilla sense temperature and humidity (Kuwabara & Takeda, 1956; Yokohari, Tominaga, & Tateda, 1982; Reborá et al., 2007). Though, electrophysiological and ultrastructural studies have shown that the SA are also receptors for CO₂ (Lacher, 1964). The presence of these sensilla only in *T. fiebrigi* females could be considered as a result of the division of labor and could enhance sensorial tasks with a direct impact on colony maintenance (Kleineidam & Tautz, 1996). In contrast to *T. fiebrigi* and *M. quadrifasciata*, SA and SCo have been found in both sexes of other Meliponini species (Ravaiano et al., 2014; Fialho et al., 2014; Campos, 2016).

The morphometric variance, analyzed through the PCA, separated males from females because those sensilla that were highly variable for the first component were those that showed extreme values of sensilla number or length for males in contrast with females. This group of sensilla (STI, STII, SB and SP) is supposedly related to olfactory perception (Hansson et al., 1995; Keil, 1997; Spaethe et al., 2007; Binyameen et al., 2012). The variability considering the second component separated the queen differences across other females (i.e., workers and soldiers). The queens show a higher mean values for the number and length of sensilla (STI, STII, STIII, STIV, STV, STVI) than the other two castes. This is a group of sensilla that sense both chemical and physical (Ågren & Hallberg, 1996; Page & Peng, 2001; Mißbach, Harzsch & Hansson, 2011; Binyameen et al., 2012) stimuli related to interaction of the bees with the environment.

When considering the number and length of antennal sensilla, *T. fiebrigi* females differed from the males, with separation occurring among the different castes of females. This distribution resulted from the different functions that males and females play in the colony, and might be influenced by stimuli perceived by the antennal sensilla (Ravaiano et al., 2014). Greater diversity of the sensilla was observed in female castes. In this case, the females share exclusive sensilla that could help them to recognize other members of the colony and help maintain the colony organization. In addition, the separation between female castes might reflect the different functions they play. The queen is responsible for laying the eggs, producing pheromones that control the workers

and maintaining colony stability. In comparison, the workers are responsible for maintaining the colony and performing various activities, such as offspring care, food collection, and cleaning and provisioning of the breeding cells (Michener, 1974; Laidlaw, 1992; Page & Peng, 2001).

The greater length of the sensilla of soldiers allowed their separation from the other females (i.e., workers and queens). The soldiers perform defense tasks and are present in several species of stingless bees, being more robust than the other females (Grüter *et al.*, 2017). The results presented here show that these differences also occur at the microanatomical level, as in the case of sensilla. These differences in the sense organs of soldiers require further study to improve our understanding of the social complexity of bees, which require an efficient system of communication among individuals.

CONCLUSION

This study is the first to describe the morphology of the antennal sensilla in *T. fiebrigi*, contributing with new information on these sensory structures of stingless bees. The information obtained is a useful tool that let us identify based on the antennae morphology the four different classes of individuals of *T. fiebrigi*. The eleven sensilla types found in this species diverged among workers, queen, soldiers, and males. The morphological differences found in the antennae of the different classes of *T. fiebrigi* might be related to the functions that individuals perform in the colony. Further investigation is required to understand the mechanisms of communication in social insects, like research on electrophysiology and fine structure of the sensillum to understand accurately the role of classes on developing nest tasks.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG CBB - APQ-00247-14), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico for financial support. To NMM/UFV for technical assistance. To Juan Manuel Diaz Soto for helping with statistical analyses. We also thank the anonymous reviewers for their comments.

REFERENCES

- Ågren, L. & Hallberg, E. (1996). Flagellar sensilla of bumble bee males (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*). *Apidologie*. **27**, 433–444.
- Al Ghamdi, A.A. (2006). Scanning electron microscopic studies on antennal sensilla organs of adult honey bee workers in genus *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Bull. Ent. Soc. Egypt*. **83**, 1–11.
- Binyameen, M., Anderson, P., Ignell, R., Seada, M. A., Hansson, B. S. & Schlyter, F. (2012). Spatial organization of antennal olfactory sensory neurons in the female *Spodoptera littoralis* moth: differences in sensitivity and temporal characteristics. *Chem. Senses*. **37**, 613–629.
- Campos, D.D. (2016). Análise morfológica das sensilas antenais das abelhas *Melipona interrupta* Latreille, 1811 e *Melipona seminigra* Friese, 1903.
- Carvalho, W.J., Fujimura, P.T., Bonetti, A.M., Goulart, L.R., Cloonan, K., da Silva, N.M., Araújo, E.C.B., Ueira-Vieira, C. & Leal, W.S. (2017). Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of *Melipona scutellaris* stingless bee. *PLoS One*. **12**, e0174857.
- Chen, H.H., Zhao, Y.X. & Kang, L. (2003). Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits. *J. Biosci.* **28**, 743–752.
- Cruz-Landim, C. (2009). Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Ed. UNESP.
- De Bruyne, M. & Baker, T.C. (2008). Odor detection in insects: volatile codes. *J. Chem. Ecol.* **34**, 882–897.
- Denison, R. & Raymond-Delpech, V. (2008). Insights into the molecular basis of social behaviour from studies on the honeybee, *Apis mellifera*. *Invertebr. Neurosci.* **8**, 1–9.
- Dietz, A. & Humphreys, W.J. (1971). Scanning electron microscopic studies of antennal receptors of the worker honey bee, including *sensilla campaniformia*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **64**, 919–925.
- Dohanik, V.T., Souza, E.A., Lisboa, L.C.O., Zanúncio, J.C. & Serrão, J.E. (2017). Development of antennal sensilla of *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini) during pupation. *Brazilian J. Biol.* **77**, 284–288.

- Ebbinghaus, D., Lösel, P.M., Lindemann, M., Scherckenbeck, J. & Zebitz, C.P.W. (1997). Detection of major and minor sex pheromone components by the male codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Insect Physiol.* **44**, 49–58.
- Elgar, M.A., Zhang, D., Wang, Q., Wittwer, B., Pham, H.T., Johnson, T.L. & Coquilleau, M. (2018). Focus: Ecology and Evolution: Insect Antennal Morphology: The Evolution of Diverse Solutions to Odorant Perception. *Yale J. Biol Med.* **91**, 457.
- Engels, W., Engels, E. & Francke, W. (1997). Ontogeny of cephalic volatile patterns in queens and mating biology of the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Invertebr. Reprod. & Dev.* **31**, 251-256.
- Engels, E., Engels, W., Lübke G., Schröder W., & Francke W. (1993). Age-related patterns of volatile cephalic constituents in queens of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* Latr (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie.* **24**, 539–548.
- Esslen, J. & Kaissling, K.E. (1976). Zahl und Verteilung antennaler Sensillen bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphology.* **83**, 227–251.
- Esteban, L., Angulo, V.M., Feliciangeli, M.D. & Catalá, S. (2005). Analysis of antenal sensilla patterns of *Rhodnius prolixus* from Colombia and Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**, 909–914.
- Euzébio, D.E., Martins, G.F. & Fernandes-Salomão, T.M. (2013). Morphological and morphometric studies of the antennal sensilla from two populations of *Atta robusta* (Borgmeier 1939) (Hymenoptera: Formicidae). *Brazilian J. Biol.* **73**, 663–668.
- Faucheux, M.J., Kristensen, N.P. & Yen, S.H. (2006). The antennae of neopseustida moths: Morphology and phylogenetic implications, with special reference to the sensilla (Insecta, Lepidoptera, Neopseustidae). *Zool. Anzeiger.* **245**, 131–142.
- Fernandes, F.D.F., Pimenta, P.F.P. & Linardi, P.M. (2004). Antennal sensilla of the new world screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med Entomol.* **41**, 545–551.
- Fialho, M.D.C.Q, Guss-Matiello, C.P., Zanúncio, J.C., Campos, L.A.O. & Serrão, J.E. (2014). A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. *J. Apic. Res.* **53**, 392–403.
- Fierro, M. M., Cruz-López, L., Sánchez, D., Villanueva-Gutiérrez, R. & Vandame, R. (2011). Queen volatiles as a modulator of *Tetragonisca angustula* drone behavior.

- J. Chem. Ecol.* **37**, 1255-1262.
- Frasnelli, E., Anfora, G., Trona, F., Tessarolo, F. & Vallortigara, G. (2010). Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav. Brain Res.* **209**, 221–225.
- Galvani, G.L., González, A., Roig-Alsina, A.H. & Settembrini, B.P. (2012). Distribution and morphometric studies of flagellar sensilla in Emphorini bees (Hymenoptera, Apoidea). *Micron.* **43**, 673–687.
- Galvani, G. L., González-Vaquero, R. A., Guerra-Navarro, C. & Settembrini, B. P. (2017). Antennal sensilla of cleptoparasitic and non-parasitic bees in two subfamilies of Apidae. *Apidologie*, **48**, 437–449.
- González-Vaquero, R. A. & Galvani, G. L. (2016). Antennal sensilla analyses as useful tools in the revision of the sweat-bee subgenus *Corynura* (*Callistochlora*). Michener (Hymenoptera: Halictidae). *Zoologischer Anzeiger-A J. Comp. Zool.* **262**, 29–42.
- Getz, W.M. & Akers, R.P. (1993). Olfactory response characteristics and tuning structure of placodes in the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie.* **24**, 195–217.
- Giannakakis, A. & Fletcher, B.S. (1985). Morphology and distribution of antennal sensilla of *Dacus tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). *Australian J. Entomol.* **24**, 31-35.
- Grüter, C., Segers, F.H.I.D., Menezes, C., Vollet-Neto, A., Falcón, T., von Zuben, L., Bitondi, M.M.G., Nascimento, F.S. & Almeida, E.A.B. (2017). Repeated evolution of soldier sub-castes suggests parasitism drives social complexity in stingless bees. *Nat. Commun.* **8**, 4.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Rian, P.D. (2016). Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis: version. 1.37. 2011.
- Hansson, B.S. & Stensmyr, M.C. (2011). Evolution of insect olfaction. *Neuron.* **72**, 698–711.
- Hansson, B.S., Blackwell, A., Hallberg, E. & Löfqvist, J. (1995). Physiological and morphological characteristics of the sex pheromone detecting system in male corn stemborers, *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Insect Physiol.* **41**, 171–178.
- Jamovi project. (2018). jamovi (Version 0.9) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.
- Katzav-Gozansky, T., Soroker, V., Ibarra, F., Francke, W. & Hefetz A. (2001). Dufour's

gland secretion of the queen honeybee (*Apis mellifera*): an egg discriminator pheromone or a queen signal?. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **51**, 76–86.

- Keil, T.A. (1997). Comparative morphogenesis of sensilla: a review. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **26**, 151–160.
- Keil, T. A. (1999). Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In *Insect olfaction*. 5–47. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kleineidam, C. & Tautz, J. (1996). Perception of carbon dioxide and other “air-condition” parameters in the leaf cutting ant *Atta cephalotes*. *Naturwissenschaften* **83**, 566–568.
- Kuwabara, M. & Takeda, K. (1956). On the hygroreceptor of the honey bee. *Apis mellifera. Physiol. Ecol.* **7**, 1–6.
- Lacher, V. (1964). Elektrophysiologische untersuchungen an einzelnen rezeptoren für geruch, kohlendioxyd, luftfeuchtigkeit und tempratur auf den antennen der arbeitsbiene und der drohne (*Apis mellifica* L.). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **48**, 587–623.
- Laidlaw, H.H. (1992). Production of queens and package bees. *The hive and honey bee* 989–1042.
- Ma, R.Y. & Du, J.W. (2000). Insect antennal sensilla. *Entomol. Knowl.* **37**, 179–183.
- Marques-Silva, S., Matiello-Guss, C.P., Delabie, J.H.C., Mariano, C.S.F., Zanuncio, J.C. & Serrão, J.E. (2006). Sensilla and secretory glands in the antennae of a primitive ant: *Dinoponera lucida* (Formicidae: Ponerinae). *Microsc. Res. Tech.* **69**, 885–890.
- Mißbach, C., Harzsch, S. & Hansson, B.S. (2011). New insights into an ancient insect nose: the olfactory pathway of *Lepismachilis γ -signata* (Archaeognatha: Machilidae). *Arthropod Struct. Dev.* **40**, 317–333.
- Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study*. Vol. 73. Harvard University Press.
- Michener, C.D. (2007). *The bees of the world*. 2nd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Monnin, T. (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. In *Ann. Zool Fennici*, 515–530.
- Moraes, R.S. & Landim, C.D.C. (1972). Estudo comparativo de órgãos sensoriais em abelhas com diferentes tipos de comunicação. *Rev. Brasil Biol.* **32**, 185–196.

- Must, A., Merivee, E., MÄNd, M., Luik, A. & Heidemaa, M. (2006). Electrophysiological responses of the antennal campaniform sensilla to rapid changes of temperature in the ground beetles *Pterostichus oblongopunctatus* and *Poecilus cupreus* (Tribe Pterostichini) with different ecological preferences. *Physiol. Entomol.* **31**, 278–285.
- Mysore, K., Shyamala, B.V. & Rodrigues, V. (2010). Morphological and developmental analysis of peripheral antennal chemosensory sensilla and central olfactory glomeruli in worker castes of *Camponotus compressus* (Fabricius, 1787). *Arthropod Struct. Dev.* **39**, 310–321.
- Nakanishi, A., Nishino, H., Watanabe, H., Yokohari, F. & Nishikawa, M. (2009). Sex-specific antennal sensory system in the ant *Camponotus japonicus*: structure and distribution of sensilla on the flagellum. *Cell Tissue Res.* **338**, 79–97.
- Nascimento, M.A., Salomão, T.M.F. & Martins, G. (2013). Estudo comparativo das sensilas antenais de operárias de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes. *EntomoBrasilis.* **6**, 64–67.
- Nation, J.L. (2002). *Insect physiology and biochemistry*. Boca Raton: CRC Press.
- Neto, P. (1997). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. Nogueirapis.
- Ochieng, S.A., Park, K.C., Zhu, J.W. & Baker, T.C. (2000). Functional morphology of antennal chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Arthropod Struct. Dev.* **29**, 231–240.
- Onagbola, E.O., Boina, D.R., Hermann, S.L. & Stelinski, L.L. (2009). Antennal sensilla of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **102**, 523–531.
- Ozaki, M., Wada-Katsumata, A., Fujikawa, K., Iwasaki, M., Yokohari, F., Satoji, Y., Nisimura, T. & Yamaoka, R. (2005). Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Sci.* **309**, 311–314.
- Page, R.E. & Peng, C.Y.-S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* **36**, 695–711.
- Ravaiano, S.V., de Paiva Ferreira, R., de Oliveira Campos, L.A. & Martins, G.F. (2014). The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. *Naturwissenschaften.* **101**, 603–611.
- Rebora, M., Piersanti, S., Almaas, T.J. & Gaino, E. (2007). Hygroreceptors in the larva of *Libellula depressa* (Odonata: Libellulidae). *J. Insect Physiol.* **53**, 550–558.

- Renthal, R., Velasquez, D., Olmos, D., Hampton, J. & Wergin, W.P. (2003). Structure and distribution of antennal sensilla of the red imported fire ant. *Micron*. **34**, 405–413.
- Sakagami, S.F. & Oniki, Y. (1963). Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process. I.: *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. VI, Zool.* **15**, 300–318.
- Schneider, D. (1964). Insect antennae. *Annu. Rev. Entomol.* **9**, 103–122.
- Shanbhag, S.R., Müller, B. & Steinbrecht, R.A. (1999). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*: 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **28**, 377–397.
- Sheridan, S.L., Iversen, K.A. & Itagaki, H. (1996). The role of chemical senses in seed-carrying behavior by ants: A behavioral, physiological, and morphological study. *J. Insect. Physiol.* **42**, 149–159.
- Silva, C.C.A., de Capdeville, G., Moraes, M.C.B., Falcão, R., Solino, L.F., Laumann, R.A., Silva, J.P. & Borges, M. (2010). Morphology, distribution and abundance of antennal sensilla in three stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *Micron*. **41**, 289–300.
- Silveira, F.A., Melo, G.A. & Almeida, E.A. (2002). Abelhas brasileiras. *Sistemática e Identificação. Fundação Araucária, Belo Horizonte*, 253.
- Spaethe, J., Brockmann, A., Halbig, C. & Tautz, J. (2007). Size determines antennal sensitivity and behavioral threshold to odors in bumblebee workers. *Naturwissenschaften*. **94**, 733–739.
- Stort, A.C. & Barelli, N. (1981). Antennal sensory structures of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). *J. Kansas. Entomol. Soc.* 751–756.
- Stort, A.C. & Moraes-Alves, M.M.B. (1999). Differences in the number of antennal sensory structures of males of three honey bee types. *Rev. Bras. Biol.* **59**, 161–166.
- Team, J.A.S.P. (2018). JASP (Version 0.8.5.1) [Computer software]. 2017.
- Velthuis, H.H.W., Koedam, D. & Imperatriz-Fonseca, V.L. (2005). The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie*. **36**, 169–185.
- Verdugo-Dardon, M., Cruz-Lopez, L., Malo, E. A., Rojas, J. C. & Guzman-Diaz, M. (2011). Olfactory attraction of *Scaptotrigona mexicana* drones to their virgin queen volatiles. *Apidologie*, **42**, 543-550.

- Wenninger, E.J., Hall, D.G. & Mankin, R.W. (2009). Vibrational communication between the sexes in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **102**, 547–555.
- Wittwer, B. & Elgar, M.A. (2018). Cryptic castes, social context and colony defence in a social bee, *Tetragonula carbonaria*. *Ethol.* **124**, 617–622.
- Yan, S.C., Meng, Z.J., Peng, L. & Liu, D. (2011). Antennal sensilla of the pine weevil *Pissodes nitidus* Roel (Coleoptera: Curculionidae). *Microsc. Res. Tech.* **74**, 389–396.
- Yokohari, F., Tominaga, Y. & Tateda, H. (1982). Antennal hygroreceptors of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Cell Tissue Res.* **226**, 63–73.
- Yokohari, F. (1983). The coelocapitular sensillum, an antennal hygro- and thermoreceptive sensillum of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Cell Tissue Res.* **233**, 355–365.
- Zacharuk, R.Y. (1985). Antennae and sensilla. *Compr. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.* **6**, 1–69.
- Zhang, S., Zhang, Z., Kong, X. & Wang, H. (2013). Sexual dimorphism in antennal morphology and sensilla ultrastructure of *Dendrolimus tabulaeformis* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Microsc. Res. Tech.* **76**, 50–57.

TABLES

Table 1. Distribution of sensilla on the dorsal surface of the antennae of *Tetragonisca fiebrigi*

Class	Flagellomere										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Workers	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
		SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
											SB
											SA
											SCo
Soldiers	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
		SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
											SB
											SA
											SCo
Males	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
		SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
											SCp
Queens	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
		SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
											SB
											SA
											SCo
											SCp

ST = sensilla trichodea (including types I to VI), SP = sensilla placodea, SB = basiconica sensilla, SA = sensilla ampullacea, SCo = sensilla coeloconica, SCp = sensilla campaniformia

Table 2. Number of sensilla (mean and standard error mean) in the antennal segments of *Tetragonisca fiebrigi*. Different letters in the same column indicate significant statistical differences by the Dwass-Steel-Critchlow-Fligner test ($p < 0.05$).

Class	STI	STII	STIII	STIV	STV	STVI	SP	SB	SCp	SCo	SA
Male	46,3 ($\pm 2,53$)a	3,98 ($\pm 0,37$)c	4,55 ($\pm 2,19$)a	1,05 ($\pm 0,51$)a	2,7 ($\pm 1,30$)a	1,4 ($\pm 0,68$)a	28,8 ($\pm 1,58$)a	-	0,30 ($\pm 0,15$)a	-	-
Queen	42,6 ($\pm 3,40$)b	9,95 ($\pm 1,06$)b	5,05 ($\pm 3,48$)a	2,65 ($\pm 1,82$)a	6,9 ($\pm 4,75$)a	3,7 ($\pm 2,55$)a	10,6 ($\pm 9,16$)c	1,3 ($\pm 0,90$)a	0,55 ($\pm 0,38$)a	0,55 ($\pm 0,39$)a	0,4 ($\pm 0,27$)a
Worker	41,4 ($\pm 1,23$)b	13,7 ($\pm 0,56$)a	6,94 ($\pm 1,77$)a	1,96 ($\pm 0,51$)a	4,84 ($\pm 1,21$)a	2,1 ($\pm 0,55$)a	13,8 ($\pm 0,43$)b	1,77 ($\pm 0,46$)a	0,51 ($\pm 0,13$)a	0,38 ($\pm 0,099$)a	0,4 ($\pm 0,114$)a
Soldier	31,3 ($\pm 2,50$)c	9,8 ($\pm 1,11$)b	6,1 ($\pm 4,20$)a	1,15 ($\pm 0,83$)a	5,5 ($\pm 3,79$)a	2,2 ($\pm 1,52$)a	11,2 ($\pm 0,95$)c	1,55 ($\pm 1,08$)a	0,50 ($\pm 0,35$)a	0,45 ($\pm 0,312$)a	0,35 ($\pm 0,244$)a

Table 3. Length of the sensilla (mean and standard error mean) of the antennal segments of *Tetragonisca fiebrigi*. Different letters in the same column indicate significant statistical differences by the Dwass-Steel-Critchlow-Fligner test ($p < 0.05$).

Class	STI	STII	STIII	STIV	STV	STVI	SP	SB	SCp	SCo	SA
Male	19,6 ($\pm 0,27$)a	9,17 ($\pm 0,20$)c	11 ($\pm 0,32$)c	10,5 ($\pm 0,22$)c	11,3 ($\pm 0,20$)b	13,4 ($\pm 0,37$)b	11,8 ($\pm 0,19$)b	-	0,47($\pm 0,12$)b	-	-
Queen	16,1 ($\pm 0,23$)b	10,5 ($\pm 0,24$)a	18 ($\pm 0,43$)a	17,6 ($\pm 0,57$)a	17,3 ($\pm 0,33$)a	22,4 ($\pm 0,57$)a	15,1 ($\pm 0,30$)a	12 ($\pm 0,32$)a	1,58 ($\pm 0,34$)a	0,89 ($\pm 0,17$)a	0,32 ($\pm 0,09$)a
Worker	15,8 ($\pm 0,15$)b	9,83 ($\pm 0,10$)b	11,9 ($\pm 0,13$)b	11,2 ($\pm 0,13$)b	11,2 ($\pm 0,13$)b	12,2 ($\pm 0,13$)c	15,2 ($\pm 0,14$)a	10,4 ($\pm 0,15$)b	0,95($\pm 0,09$)a	0,41 ($\pm 0,05$)b	0,19 ($\pm 0,02$)a
Soldier	15,2 ($\pm 0,40$)c	8,83 ($\pm 0,30$)c	11,1 ($\pm 0,28$)c	10,1 ($\pm 0,20$)c	11,6 ($\pm 0,30$)b	11,9 ($\pm 0,26$)c	15,1 ($\pm 0,43$)a	10 ($\pm 0,28$)b	0,77 ($\pm 0,18$)a	0,64 ($\pm 0,17$)a	0,21 ($\pm 0,07$)a

FIGURES

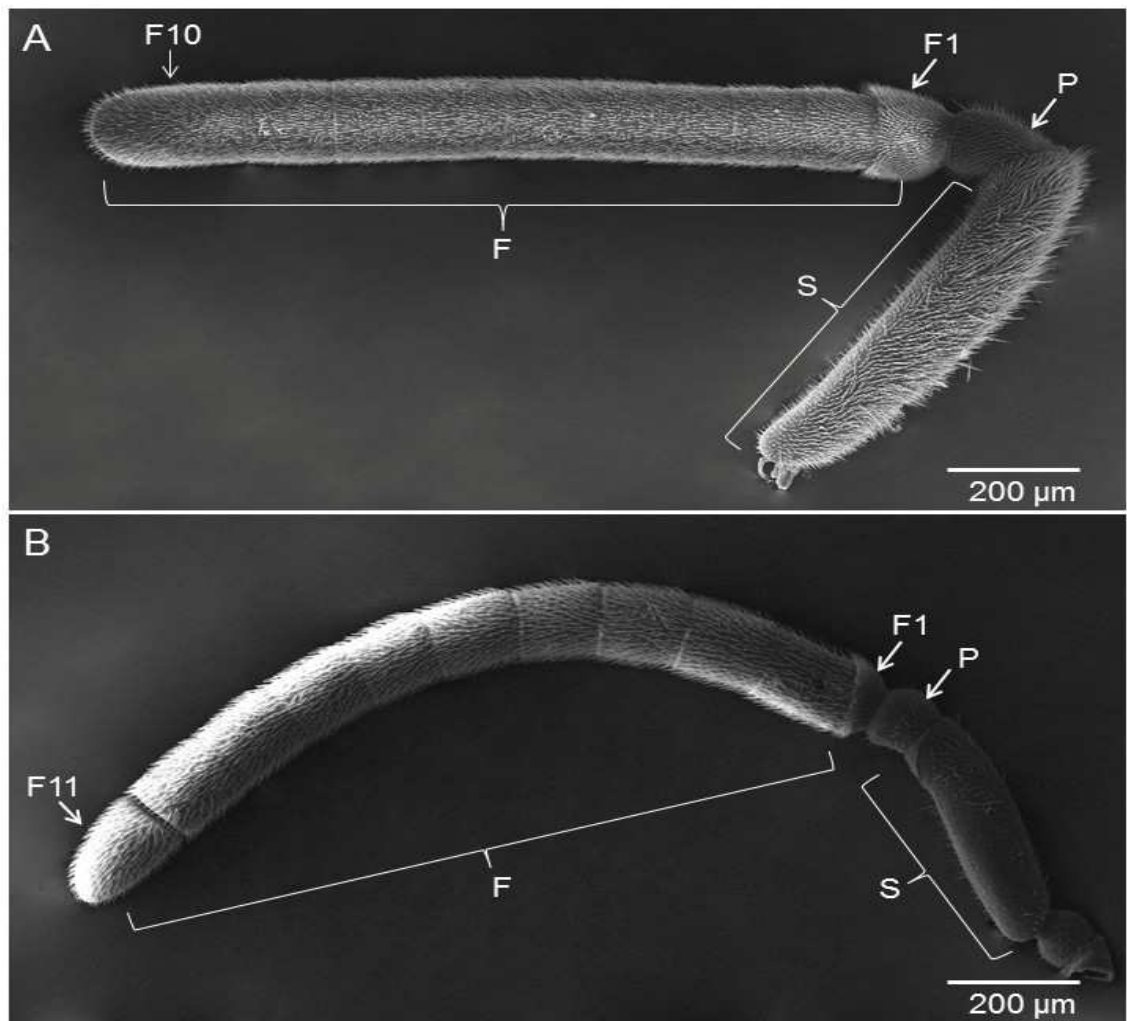


Figure 1. Scanning electron micrographs of the dorsal surface of *Tetragonisca fiebrigi* antennae, showing the scape (S), pedicel (P), and flagellum (F) subdivided into 10 flagellomeres in the queen (A) and 11 flagellomeres in the male (B).

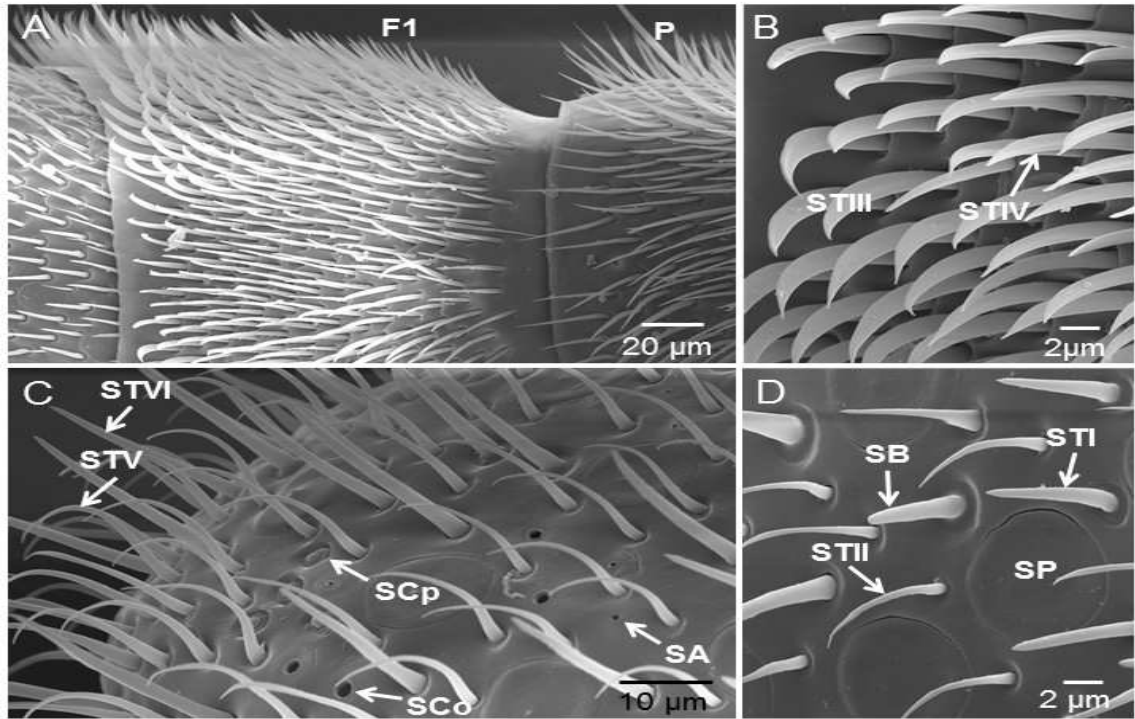


Figure 2. Scanning electron micrographs showing details of the dorsal antenna surface of a queen of *Tetragonisca fiebrigi*. A: proximal part of the antenna with the scape and flagellomere 1 (F1). B: Sensilla trichodea III (STIII) and sensilla trichodea IV (STIV) in F1. C: Tip of the antennae (F10) with sensilla trichodea V and VI (STV and STVI), sensilla ampullacea (SA), sensilla coeloconica (SCo), and sensilla campaniformia (SCp). D: Sensilla placodea (SP), basiconica (SB), sensilla trichodea I (STI), and sensilla trichodea II (STII) in F10.

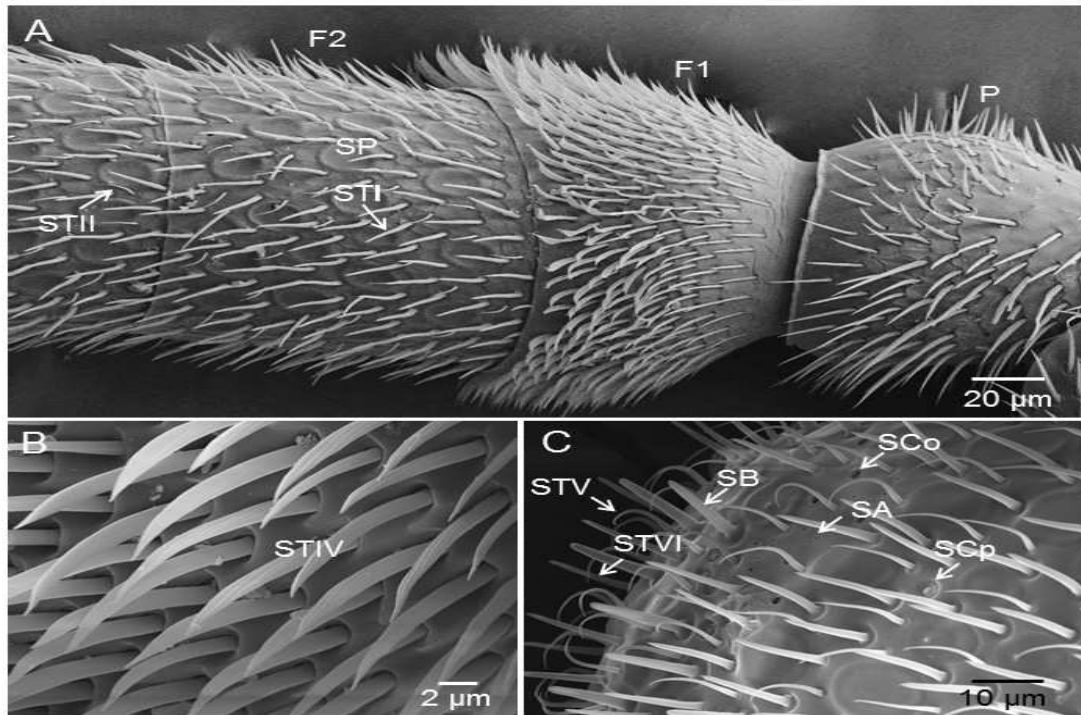


Figure 3. Scanning electron micrographs showing details of the antennal sensilla of *Tetragonisca fiebrigi*. A: Proximal part of the antenna of a worker with the scape, sensilla trichodea type I and II (STI and STII), sensilla placodea (SP). Flagellomeres 1 and 2 (F1 and F2). B: Sensilla trichodea type V (STIV) in the F1 of a soldier. C: Tip of the antenna (F10) with sensilla trichodea type V and VI (STV and STVI), sensilla basiconica (SB), sensilla coeloconica (SCo), sensilla ampullacea (SA), and sensilla campaniformia (SCp).

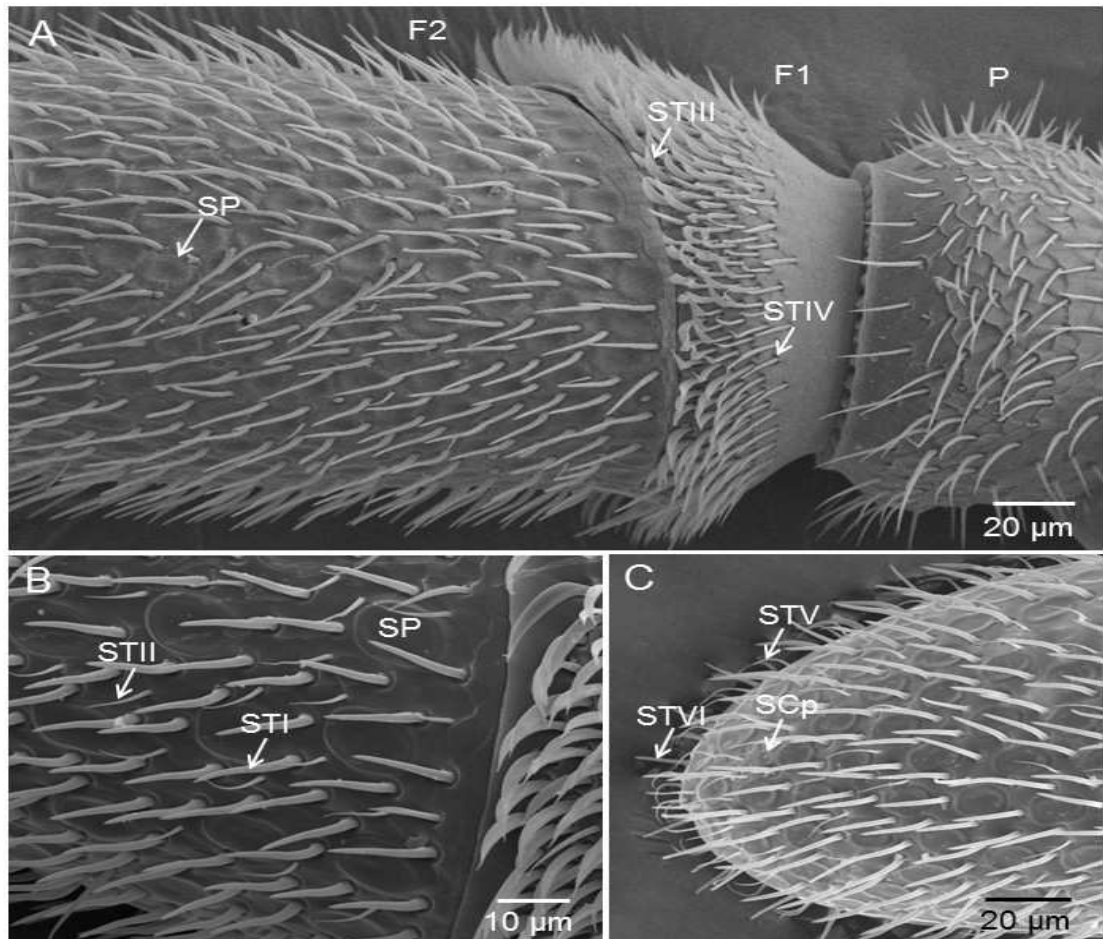


Figure 4. Scanning electron micrographs showing details of the antennal sensilla in *Tetragonisca fiebrigi* males. A: Proximal part of the antenna, flagellomere 1 (F1), showing sensilla trichodea of the types III and IV (STIII and STIV) and flagellomere 2 (F2) with sensilla placodea (SP). B: Sensilla trichodea of types I and II (STI and STII) and sensilla placodea (SP) in F2. C: Tip of the antenna (F10) with sensilla trichodea of types V and VI (STV and STVI) and sensilla campaniformia (SCp).

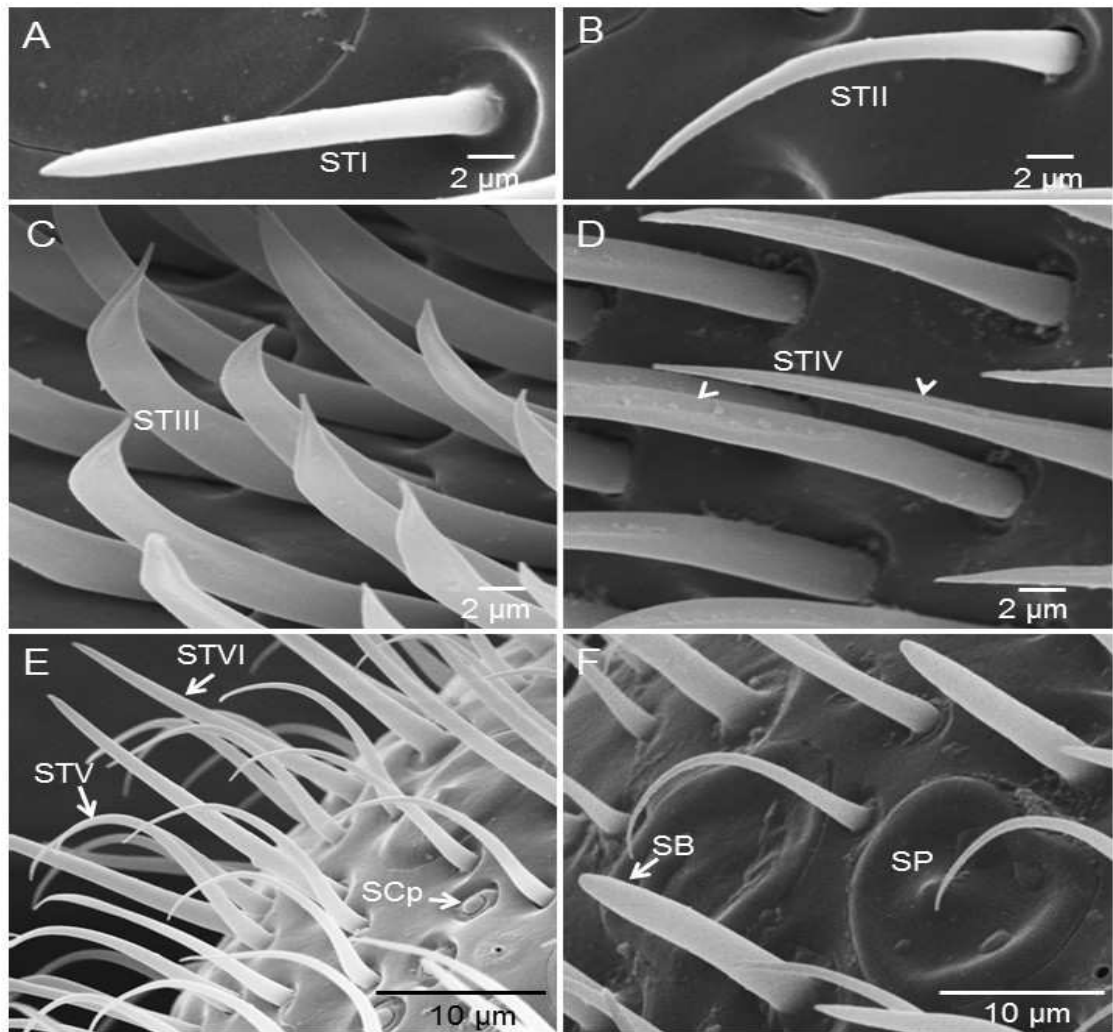


Figure 5. Scanning Electron Micrographs (SEM) from dorsal side of antennae of *Tetragonisca fiebrigi*. A: sensilla trichodea I (STI) of male bee B: Sensilla trichodea II (STII) of male bee C: Sensilla trichodea III (STIII) of soldier bee D: Sensilla trichodea IV (STIV) with longitudinal grooves arranged in a helical fashion (arrowhead) of soldier bee. E: Flagellomere 10 showing sensilla trichodea V (STV), trichodea VI (STVI) and sensilla campaniformia Scp of a worker bee. F: Sensilla basiconica (SB) and sensilla placodea (SP) of a worker bee.

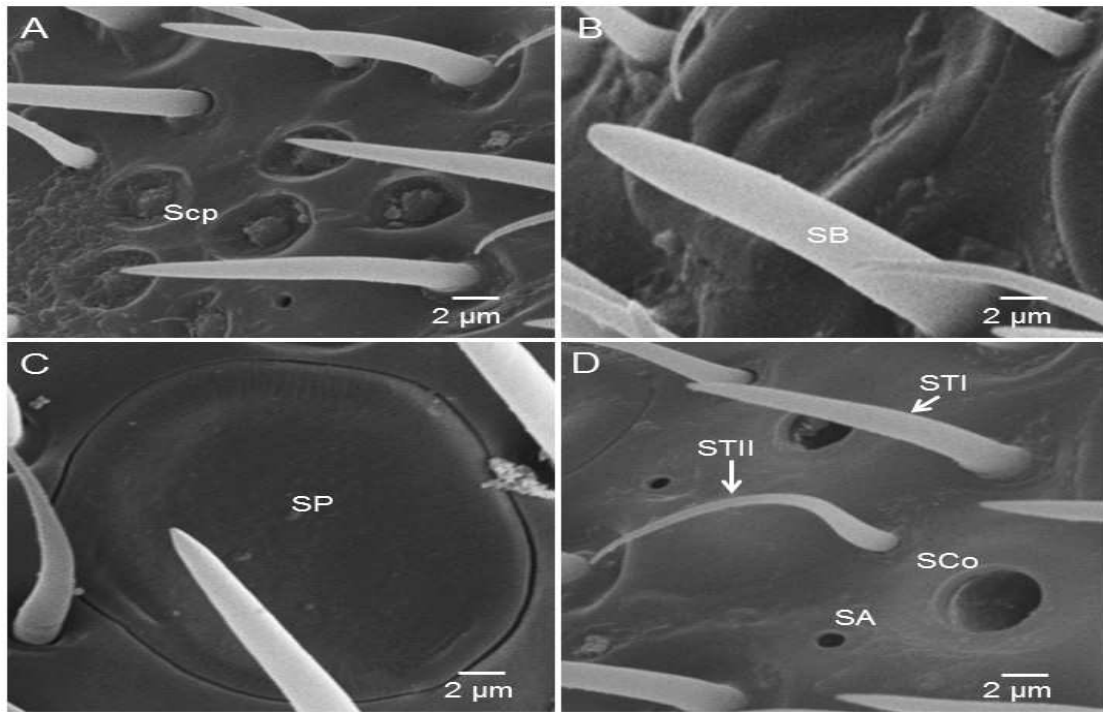


Figure 6. Scanning electron micrographs showing details the tip flagellomere 10 of the dorsal antenna surface of a queen of *Tetragonisca fiebrigi*. A: Sensilla campaniformia (Scp), B: Sensilla basiconica (SB). C: Sensilla placodea (SP). D: Sensilla trichodea I (STI), Sensilla trichodea II (STII), sensilla ampullacea (SA) and sensilla coeloconica (SCo).

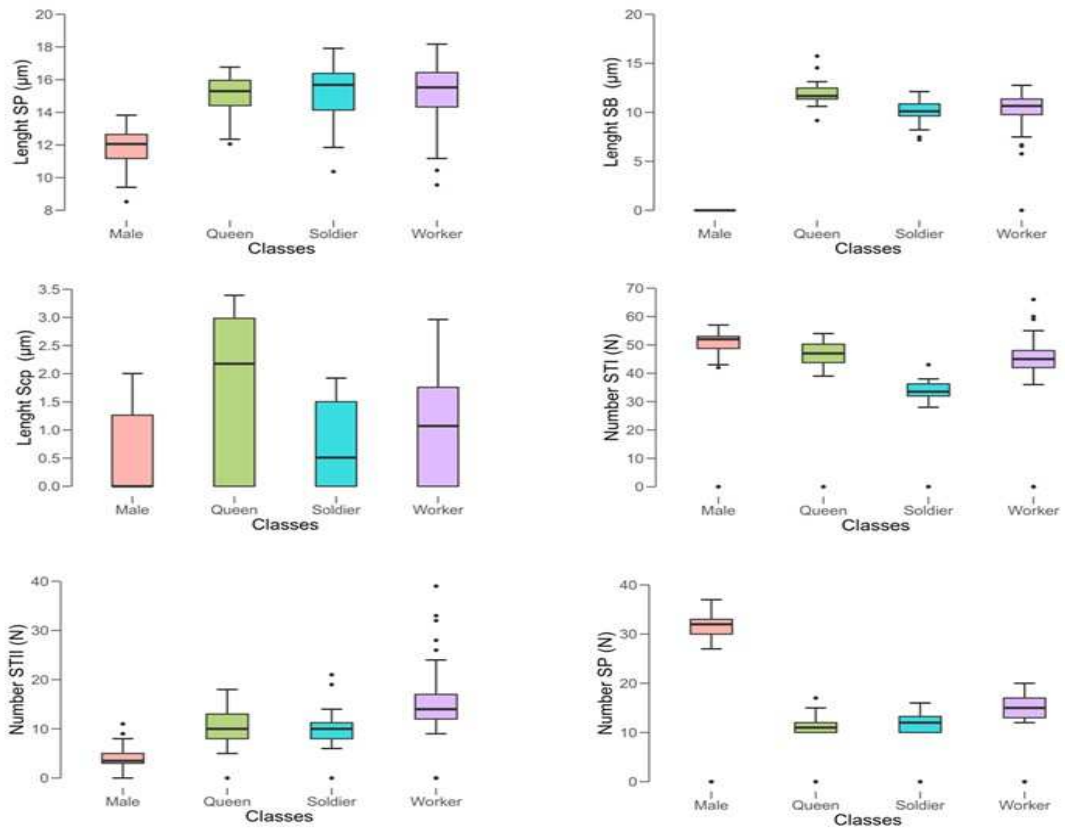


Figure 7. Length (μm) and number (N) of sensilla of the different classes of *Tetragonisca fiebrigi* individuals. Sensila placoide (SP), sensila basiconica (SB), sensila campaniformia (Scp), sensila trichodea I (STI), and sensila trichodea II (STII). Bars of the boxplot represent the median, and the 25 and 75 % quartile boundaries, error bars represent range of values (excluding outliers) and points represent outliers.

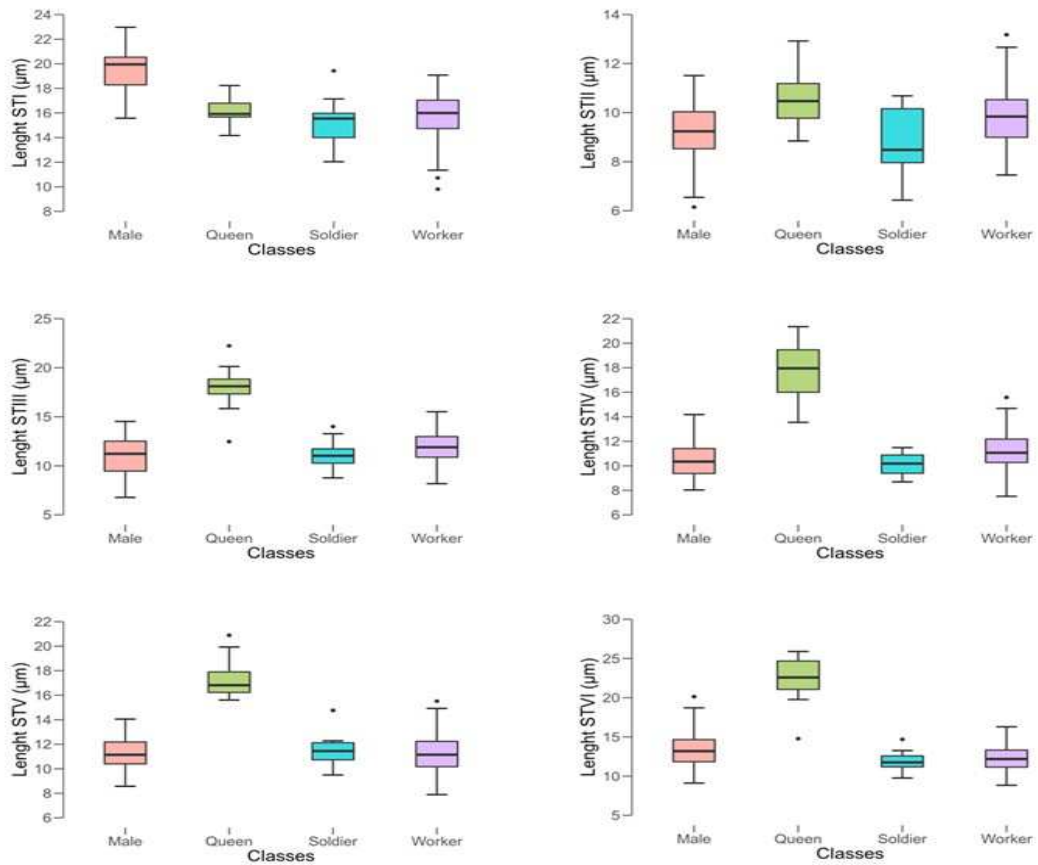


Figure 8. Length (μm) of sensilla trichodea (STI-STVI) of the different classes of *Tetragonisca fiebrigi* individuals. Bars of the boxplot represent the median, and the 25 and 75 % quartile boundaries. Error bars represent range of values (excluding outliers) and points represent outliers.

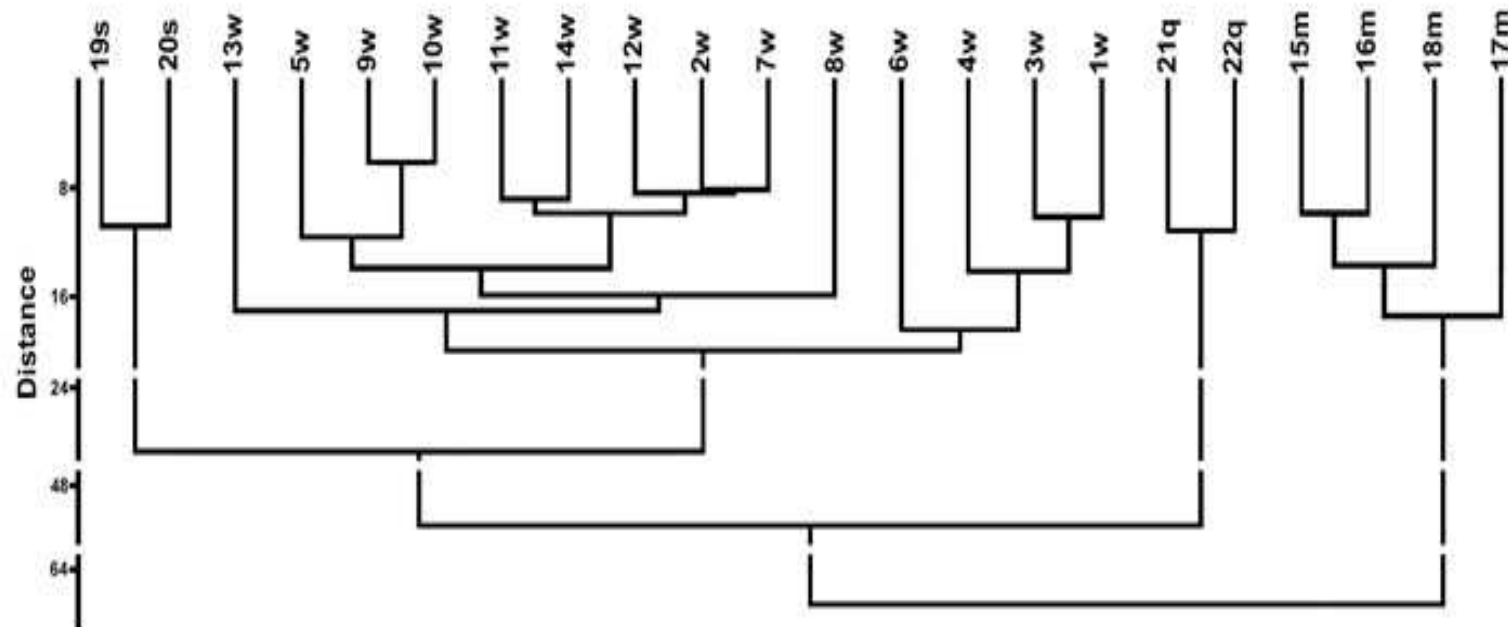


Figure 9. Dendrogram obtained by means of UPGMA grouping using the Manhattan Distance measure on the dataset of length and number of antennal sensilla of different classes of *Tetragonisca fiebrigi* individuals. Number: corresponds to identification or individual. s: soldier; w: worker; q: queen; m: male.

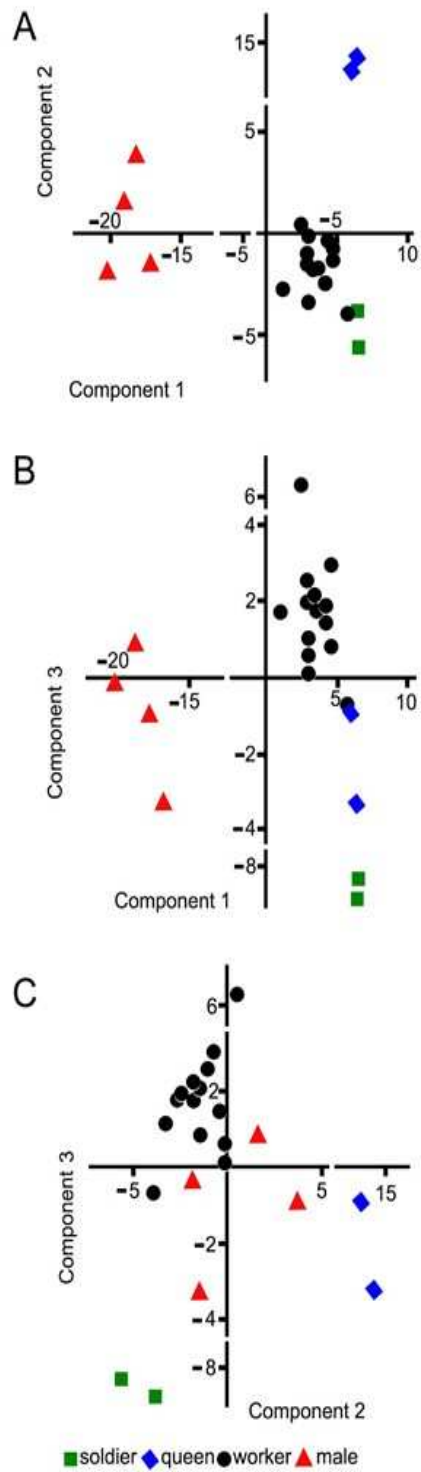


Figure 10. Principal coordinate of analysis (PCA) of the characteristics of the antennal sensilla of different classes of *Tetragnisca fiebrigi* individuals. A: Component 1 and 2, B: Component 1 and 3, and C: Component 2 and 3.

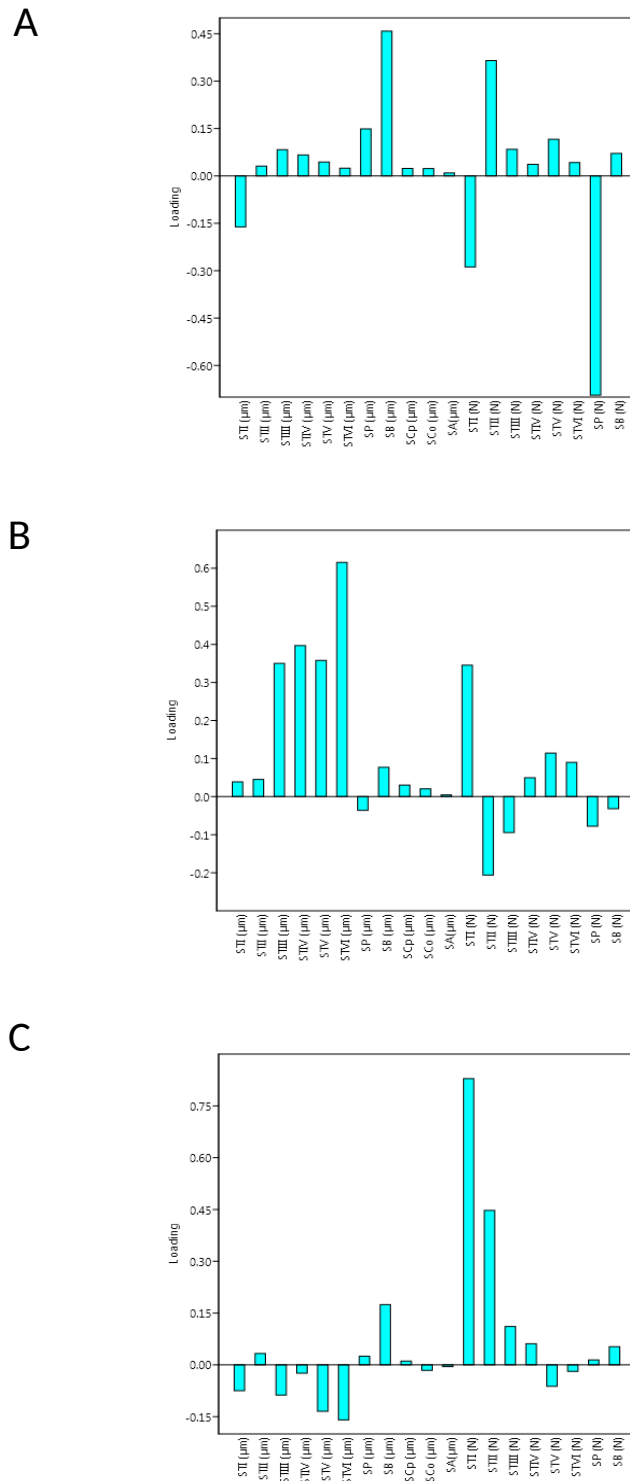
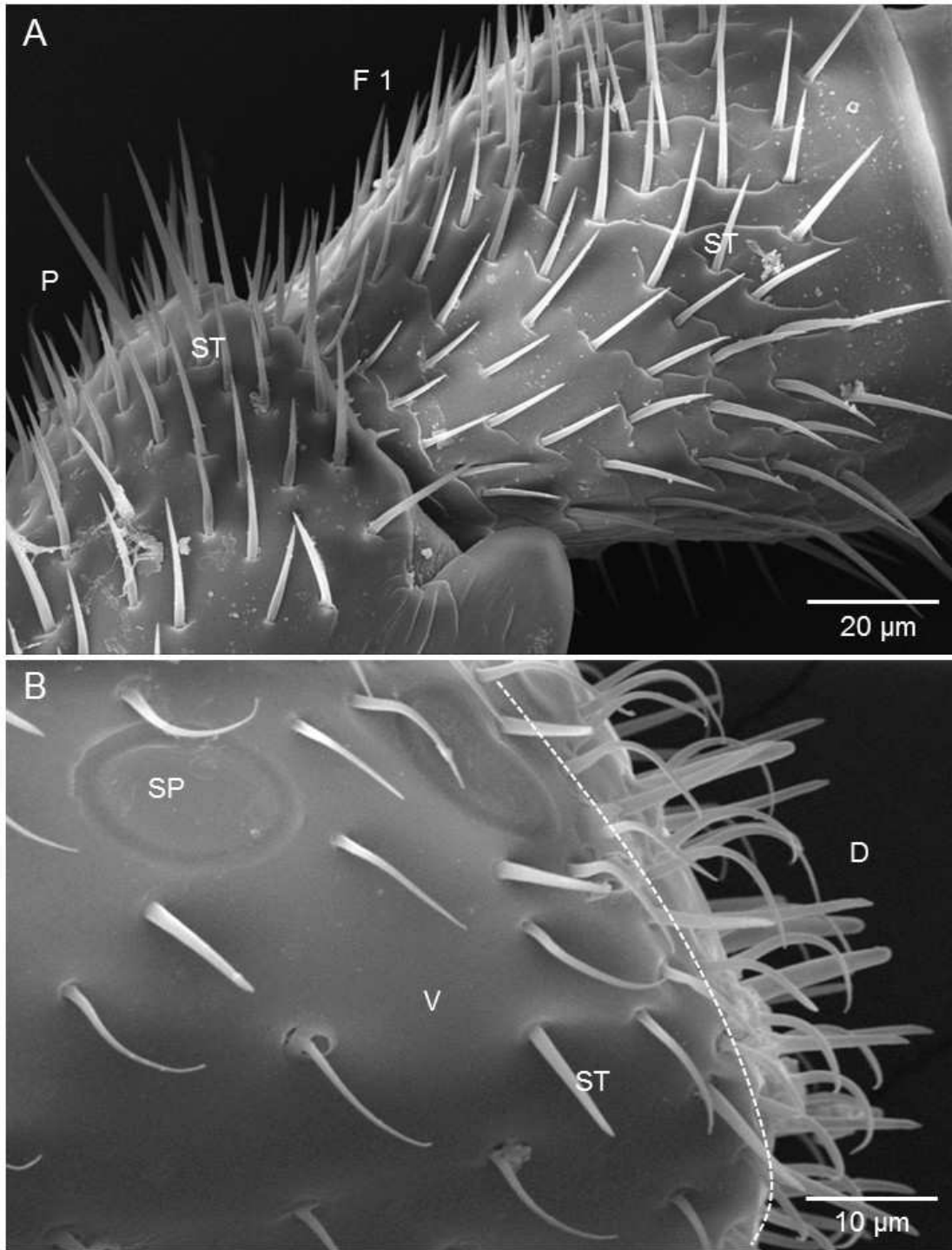


Figure 11. Loading plots for the three first principal components. Bars show the contribution of each morphometric variable to explain the distribution of different classes of individuals of *Tetragonisca fiebrigi* into the three different components.



Supporting material. Scanning Electron Micrographs (SEM) of the antenna of *Tetragonisca fiebrigi*. (A) Dorsal side of a pedicel (P) and a flagellomere (F1) of a worker and (B) ventral side of F10 of a queen. Dotted line: transition between ventral (V) and dorsal (D) antennal surfaces. ST: sensilla trichodea I; SP: sensilla placodea.

CAPÍTULO 2

Diferenciação morfométrica de sensilas antenais de operárias de *Tetragonisca angustula*, *Tetragonisca fiebrigi* e *Tetragonisca weyrauchi* (Hymenoptera: Apidae Meliponini)

Resumo

A morfologia, quantidade e distribuição das sensilas da região dorsal dos flagelos antenais foram comparados em três espécies do gênero *Tetragonisca*: *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*, utilizando as imagens de microscopia eletrônica de varredura. Também foram caracterizados os tipos e distribuição das sensilas em *T. weyrauchi*. Onze tipos de sensilas foram encontrados na superfície dorsal das antenas das três espécies: sensilas tricoides (ST; com os subtipos STI, STII, STIII, STIV, STV, STVI), sensilas placoides (SP), sensilas basicônicas (SB), sensilas campaniformes (SCp), sensilas celocônicas (SCO) e sensilas ampuláceas (SA). As sensilas possuem igual localização nos flagelômeros nas três espécies analisadas, demonstrando que as características das sensilas no gênero *Tetragonisca* são similares entre espécies próximas. Variações no tamanho e número das sensilas antenais foram encontradas nas três espécies, sendo mais pronunciadas as diferenças encontradas em *T. weyrauchi* com relação a *T. angustula* e *T. fiebrigi*, permitindo a separação completa de *T. weyrauchi* das outras duas, em todas as análises multivariadas realizadas. *T. angustula* e *T. fiebrigi* compartilham semelhanças entre os caracteres das sensilas, sugerindo que as espécies são de separação filogenética recente e que ainda conservam caracteres ancestrais.

INTRODUÇÃO

As Abelhas do gênero *Tetragonisca*, são insetos eusociais da tribo Meliponini, amplamente distribuídas nas regiões Neártica e Neotropical (Moure *et al.*, 2007). Este gênero está composto por quatro espécies, *Tetragonisca angustula*, *T. fiebrigi*, *T. weyrauchi* e *T. buchwaldi* (Camargo & Pedro, 2013), das quais no Brasil estão presentes as três primeiras espécies. Sendo que *T. weyrauchi* apresenta distribuição restrita para determinadas regiões (Cortopassi-Laurino & Nogueira-Neto, 2003; Moure *et al.*, 2007; Camargo & Pedro, 2007), com relação a *T. angustula* que esta amplamente espalhada pela América do Sul incluindo Brasil, Colômbia, Equador e Peru e América Central, enquanto que *T. fiebrigi* está restrita à Argentina, Bolívia, Brasil (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo) e Paraguai (Camargo & Pedro 2007).

Entre as espécies mais estudadas do gênero *Tetragonisca* encontram-se: *T. angustula* e *T. fiebrigi* (Camargo & Pedro, 2007) anteriormente consideradas subespécies de *T. angustula*, (*T. angustula angustula* e *T. angustula fiebrigi*), porém ainda existem problemas em relação à sistemática do gênero e alguns autores consideram que são subespécies (Francisco *et al.*, 2014), embora muito semelhantes morfológicamente, as populações destas espécies são geneticamente heterogêneas (Francisco *et al.*, 2017). Sugerindo ser na verdade um complexo de espécies já que tem introgressão entre suas populações (Francisco *et al.*, 2014).

As abelhas deste gênero são de pequeno porte, de cor amarela e suas antenas são importantes órgãos sensoriais, que estão cobertas por unidades estruturais básicas chamadas de sensilas que atuam na detecção de sinais químicos, térmicos e mecânicos do ambiente externo (Chapman *et al.*, 2013).

O conjunto de sensilas dos insetos apresenta uma notável diversidade morfológica, neste sentido a classificação dos tipos de sensila em insetos é feito com base na morfologia cuticular apoiado por estudos de ultraestrutura e eletrofisiologia, sendo classificadas em vários tipos (Schneider 1964; Fialho *et al.*, 2014; Chapman *et al.*, 2013; Ravaiano *et al.*, 2014), entre os tipos mais comuns encontramos as tricoides, placoides, basicônicas, celocônicas, ampulaceas e campaniformes.

As sensilas dos insetos apresentam diferenças morfológicas consideráveis, que sugerem que não estão distribuídas aleatoriamente (Zacharuk, 1985). O tipo, abundância e distribuição de sensilas nas antenas do inseto dependem da necessidade de seu

comportamento (Fauchex *et al.*, 2006). O padrão das sensilas pode refletir o impacto das pressões de seleção interagindo no sentido do tamanho do indivíduo, estágios de desenvolvimento, sexo, alimentação e habitats (Chapman, 1982).

O estudo da variabilidade das sensilas tem contribuído ao desenvolvimento da sistemática de alguns grupos. Por exemplo, a distribuição e a densidade das sensilas foram sugeridas como caracteres valiosos em estudos filogenéticos em formigas (Walther, 1983) e na identificação sistemática de espécies crípticas do subgênero *Corynura* (Hymenoptera: Halictidae) (González-Vaquero & Galvani, 2016). A variação entre o comprimento e a abertura do poro da sensila placóide também tem sido útil para apoiar na identificação das relações evolutivas em vespas parasitas (Hymenoptera: Braconidae) (Barlin & Vinson, 1981). Diferentes padrões de sensilas têm sido propostos como uma chave para identificar machos nas abelhas do gênero *Sphecodes* (Hymenoptera: Halictidae) com base apenas na presença e distribuição dos diferentes tipos de sensilas (Ågren & Svensson, 1982).

Em alguns casos, diferenças morfológicas das sensilas podem ser detectadas entre espécies do mesmo gênero como, tem sido apresentado em espécies parasitas do gênero *Sphecodes* (Halictidae) (Ågren & Svensson, 1982). Entre espécies de moscas (Trichoptera: Philopotamidae) as sensilas apresentaram variabilidade dimensional e estrutural (Melnitsky *et al.*, 2018). Diferenças na distribuição e estrutura das sensilas também têm sido encontrado entre espécies recentemente divergentes do gênero *Rhyacophila* (Trichoptera: Rhyacophilidae) (Valuyskiy *et al.*, 2017).

Em abelhas eusociais o número e tipos das sensilas também varia entre as espécies como exemplo em *Apis mellifera* (Frasnelli *et al.*, 2010), *Melipona scutellaris* (Nascimento *et al.*, 2013), e *Melipona quadrifasciata* (Ravaiano *et al.*, 2014) que possuem seis, sete e até treze tipos de sensilas, respectivamente. Em várias espécies da tribo Meliponini tem sido observada diferenças na distribuição e os tipos de sensilas antenais (Fialho *et al.*, 2014). Variações morfométricas das sensilas foram encontradas entre castas e sexos em várias espécies do gênero *Melipona* como: *M. quadrifasciata* (Ravaiano *et al.*, 2014) *M. scutellaris* (Carvalho *et al.*, 2017), *M. interrupta* e *M. seminigra* (Campos, 2016), além disso, dependendo da distribuição geográfica, variações tem sido encontradas nas sensilas entre populações de *M. scutellaris* de diferentes altitudes (Nascimento *et al.*, 2013).

No gênero *Tetragonisca*, já foram descritos os tipos de sensilas em *T. angustula* (Fialho *et al.*, 2014) e em *T. fiebrigi* (Juris *et al.*, submetido), sendo detectadas diferenças nos tipos e distribuição das sensilas dos flagelômeros, porém para *T. weyrauchi* as sensilas ainda não foram estudadas e muito menos comparadas com as sensilas das outras duas espécies. O exame das sensilas antenais é uma ferramenta útil para a sistemática de abelhas especialmente para a identificação de espécies crípticas, quando diferentes padrões de distribuição e abundância estão presentes (González-Vaquero & Galvani, 2016). Neste sentido, no presente trabalho apresentamos o primeiro estudo comparativo da morfometria das sensilas antenais de três espécies do gênero *Tetragonisca* com o intuito de analisar as diferenças morfométricas das sensilas e fornecer informação sobre a taxonomia e relação entre as espécies do gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Espécies estudadas

O estudo da morfometria e distribuição das sensilas antenais, foram realizados com operárias adultas de *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi* obtidas da coleção do laboratório de Biologia Molecular de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brasil). As operárias foram coletadas manualmente em diferentes regiões do Brasil (Figura 1) e conservadas em etanol 96%. No total, 78 operárias foram utilizadas, sendo dois indivíduos por colônia de 21 colônias de *T. angustula*, 14 colônias de *T. fiebrigi* e 4 colônias de *T. weyrauchi* (Tabela 1).

2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram retiradas as antenas de do lado direito cada indivíduo e desidratadas em séries crescentes de etanol (de 50% até 100%). As amostras foram lavadas em uma solução contendo 50% Etanol e 50% Hexametildizilano (HMDS) por 5 minutos agitando manualmente, posteriormente lavadas duas vezes com HMDS 100% por 10 minutos e secas à temperatura ambiente. Após a secagem, as antenas foram montadas em suportes de alumínio, metalizadas com ouro e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura MEV LEO VP1430.

3. Identificação, distribuição e caracterização dos tipos de sensilas

Usando as imagens do MEV os tipos de sensilas antenais foram identificados com base à morfologia descrita na literatura (Frasnelli *et al.*, 2010; Ravaiano *et al.*, 2014), porem devido a caracterização existente para *T. angustula* e *T. fiebrigi* (Fialho *et al.*, 2014; Juris *et al.*, submetido), somente foi realizada a caracterização morfológica dos tipos de sensilas para *T. weyrauchi*. A distribuição de cada tipo de sensila foi analisada e posteriormente comparada entre as espécies estudadas.

4. Análises morfométricos das sensilas

O número e comprimento das sensilas foi avaliado usando as imagens do MEV para as três espécies estudadas. Para determinar o número de sensilas foram contadas em uma área de tamanho fixo de 230×230 pixels de cada flagelômero utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0. As sensilas tricoides tipo V e VI estavam presentes apenas na ponta do último flagelômero, portanto, foram contadas em sua totalidade. Para o comprimento das sensilas foram medidas dez vezes os diferentes tipos de sensilas presentes em cada flagelômero usando o programa Image ProPlus 4.5 (Ravaiano *et al.*, 2014).



Figura 1. Distribuição geográfica, localidades das colônias de *Tetragonisca angustula*, *Tetragonisca fiebrigi* e *Tetragonisca weyrauchi* e formações vegetais associadas.

Tabela 1.

Localidades de amostragem para as espécies estudadas

No. Colônia	Localidade	Espécie	Latitude	Longitude
1	Palotina (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	-24.28084	-53.86719
2	Palotina (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	-24.28084	-53.86719
3	Palotina (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	-24.28084	-53.86719
4	Palotina (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	-24.28084	-53.86719
5	Palotina (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	-24.28084	-53.86719
6	Palotina (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	-24.28084	-53.86719
7	Palotina (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	-24.28084	-53.86719
8	Tangara da Serra (MT)	<i>T. fiebrigi</i>	-14.61973	-57.48752
9	Tangara da Serra (MT)	<i>T. fiebrigi</i>	-14.61973	-57.48752
10	Tangara da Serra (MT)	<i>T. fiebrigi</i>	-14.61973	-57.48752
11	Palotina (PR)	<i>T. fiebrigi</i>	-24.28084	-53.86719
12	Porto Alegre (RS)	<i>T. fiebrigi</i>	-30.03465	-51.21766
13	Cassilândia (MS)	<i>T. fiebrigi</i>	-19.10974	-51.73654
14	Porto Alegre (RS)	<i>T. fiebrigi</i>	-30.03465	-51.21766
15	Cuiabá (MT)	<i>T. weyrauchi</i>	-15.59611	-56.09666
16	Cuiabá (MT)	<i>T. weyrauchi</i>	-15.59611	-56.09666
17	Rio Branco (AC)	<i>T. weyrauchi</i>	-9.973888	-67.8075
18	Rio Branco (AC)	<i>T. weyrauchi</i>	-9.973888	-67.8075
19	Viçosa (MG)	<i>T. angustula</i>	-20.75487	-42.87858
20	Alfredo Chavez (ES)	<i>T. angustula</i>	-20.63621	-40.75007
21	Ribeirão Preto (SP)	<i>T. angustula</i>	-21.17051	-47.81025
22	Ribeirão Preto (SP)	<i>T. angustula</i>	-21.17051	-47.81025
23	Ribeirão Preto (SP)	<i>T. angustula</i>	-21.17051	-47.81025
24	Tangara da Serra (MT)	<i>T. angustula</i>	-14.61973	-57.48752
25	Governador Lindenberg (ES)	<i>T. angustula</i>	-19.19347	-40.49236
26	Redenção (PA)	<i>T. angustula</i>	-8.0257	-50.03213
27	Redenção (PA)	<i>T. angustula</i>	-8.0257	-50.03213
28	Redenção (PA)	<i>T. angustula</i>	-8.0257	-50.03213
29	Aracati (MG)	<i>T. angustula</i>	-21.41325	-42.5969
30	Coromandel (MG)	<i>T. angustula</i>	-18.47859	-47.19787
31	Lucas do Rio Verde (ES)	<i>T. angustula</i>	-13.06485	-55.91932
32	Patrocínio (MG)	<i>T. angustula</i>	-18.93803	-46.99425
33	Inhai (MG)	<i>T. angustula</i>	-17.94264	-43.62276
34	João Herba (ES)	<i>T. angustula</i>	-20.48551	-40.74826
35	Mata Fria Mutum (MG)	<i>T. angustula</i>	-19.81412	-41.44026
36	Bocaiuva (MG)	<i>T. angustula</i>	-17.11134	-43.82033
37	Brasília (D.F)	<i>T. angustula</i>	-15.79423	-47.88217
38	Brasília (D.F)	<i>T. angustula</i>	-15.79423	-47.88217
39	Taquara Mutum (MG)	<i>T. angustula</i>	-19.81412	-41.44026

5. Análises estatísticas

Os onze tipos de sensilas identificados foram utilizados como caracteres morfológicos quantitativos para as análises da variação das sensilas entre e dentro das espécies. No total, foram utilizados 22 caracteres morfométricos: 11 caracteres do comprimento e 11 caracteres de número, correspondentes a onze tipos de sensilas identificados. Para descrever a variabilidade das sensilas dentro das espécies foram realizadas análises de estatística descritiva, com o programa jamovi v.0.9 (Jamovi Project, 2018). A normalidade dos 22 caracteres foi analisada com o teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, uma análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis) foi usada para comparar as medias seguida pelo teste de Dwass-Steel Critchlow-Fligner, utilizando o programa jamovi v.0.9 (Jamovi Project, 2018).

Adicionalmente e através do programa PAST v. 3.20 (Hammer *et al.*, 2016), comparações entre espécies foram feitas utilizando os métodos de análises multivariados. Utilizou-se o teste não paramétrico de análises de variância multivariada (PERMANOVA) com base na distância de Mahalonobis e a análise de componentes principais (PCA) para discriminar as espécies com base nas características das sensilas antenais. Em seguida, o método de agrupamento hierárquico (HCA) baseado na distância de Manhattan e no método hierárquico aglomerativo UPGMA foi usado para determinar o quão similares eram entre si às colônias das diferentes espécies com base nas diferenças das sensilas. A Análise Discriminante (DA) foi utilizada para testar a significância das diferenças encontradas, considerando as interações e correlações entre todos os caracteres.

RESULTADOS

1. Estrutura antenal

As antenas de *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi* são de tipo geniculada, com três segmentos: um escapo longo, um pedicelo curto e um flagelômero com dez segmentos antenais (antenômeros) (Figura 2).

2. Caracterização morfológica das sensilas antenais de *T. weyrauchi*

Nas antenas de *T. weyrauchi* são encontrados onze tipos de sensilas classificadas como: sensilas tricoides (ST, subtipos I a VI), sensilas placoides (SP), sensilas basicônicas (SB), sensilas campaniformes (Scp), sensilas celocônicas (SCO) e sensilas ampulaceas (SA).

Sensilas tricoides (ST), são semelhantes a pelos flexíveis que variam em comprimento, sendo lisas ou estriadas e geralmente afuniladas da base até a ponta. Estas sensilas são observadas em todos os antenômeros. Seis subtipos de ST foram distinguidos: sensila tricoide I (STI), sensila tricoide II (STII), sensila tricoide III (STIII), sensila tricoide IV (STIV), sensila tricoide V (STV) e sensila tricoide VI (STVI).

As ST I são compridas, finas, com as extremidades afiladas e inclinadas para baixo, no sentido da extremidade distal da antena (Fig. 3 D). Essas sensilas não possível observar a presença de poros e são o tipo mais abundante (Tabela 2), sendo encontradas em todos flagelômeros, exceto no flagelômero 1 (Tabela 3).

As STII são o segundo subtipo de sensila mais abundante entre as tricoides (Tabela 2), sendo muito semelhantes às STI, compridas e sem poros, porém, ainda mais finas (Fig. 3 E). As STII são encontradas do flagelômero do segundo ao décimo flagelômero (Tabela 3).

As STIII possuem formato de foice, achatadas lateralmente, e com inclinação em direção à cutícula da antena (Fig. 3 A). Estão presentes somente no flagelômero 1 (Tabela 3).

As STIV são as sensilas mais compridas entre os tipos de sensilas que apresenta *T. weyrauchi* (Tabela 2). Elas são retas, inclinadas para a extremidade distal

da antena, com sulcos longitudinais, e assim com as STIII, as STIV estão presentes somente no flagelômero 1 (Fig. 3 B; Tabela 3).

As STV são encontradas somente no último flagelômero (10) especificamente no quarto final dele (Tabela 3). São compridas e finas, com a base perpendicular à cutícula antenal e a ponta inclinada em direção à extremidade distal da antena (Fig. 3 C).

As STVI estão presentes no quarto final do flagelômero 10 (Tabela 3). São sensilas retas, perpendiculares à cutícula da antena e (Fig. 3 C).

As SP constituem o segundo tipo de sensila mais abundante e o segundo tipo de sensila com maior comprimento no dorso das antenas de *T. weyrauchi* (Tabela 2). As SP são placas arredondadas, delimitadas com superfície levemente deprimida em relação à epiderme (Fig. 3 F, G), sendo encontrados do flagelômero dois até dez (Tabela 3).

As SB são pelos grossos com as extremidades arredondadas, presentes no último flagelômero (Tabela 3). (Fig. 4 B).

As SCO são estruturas arredondadas, com bordas proeminentes em relação ao nível da epiderme, marcadas pela presença de um orifício central (Fig. 3 G). As SA são depressões elípticas, sem as bordas claramente delimitadas como as SCO (Fig. 3 G). As SCO são maiores e mais abundantes do que as SA (Tabela 2). Ambas as estão distribuídas na ponta do flagelômero 10 (Tabela 3).

As SCp também são encontradas somente no flagelômero 10 (Tabela 3). Elas possuem formato de uma campânula arredondada, abaixo do nível da epiderme em que se destaca um pequeno círculo central onde a cutícula apresenta-se proeminente (Fig. 4 A).

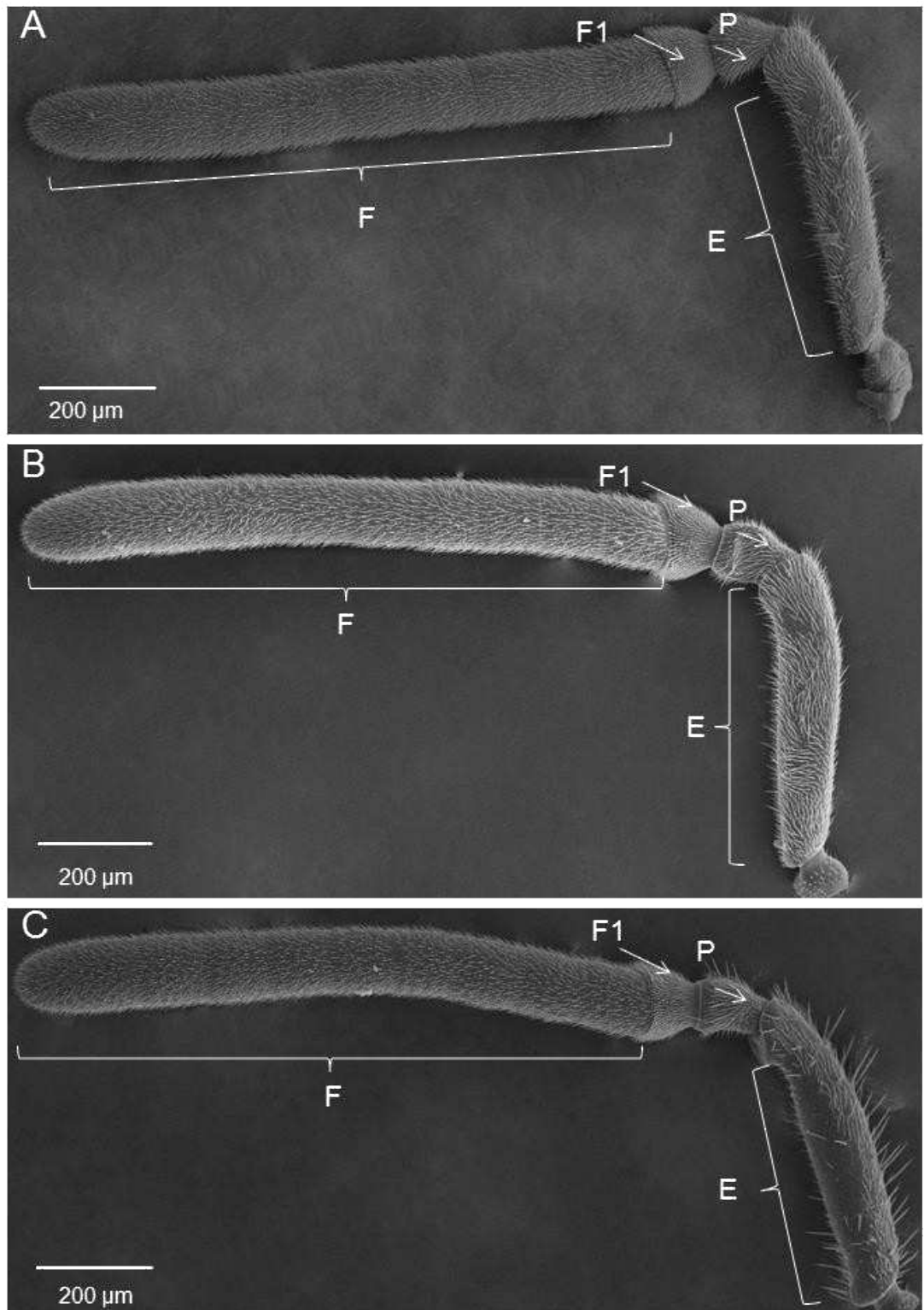


Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura de antenas de operárias adultas de *Tetragonisca* (vista dorsal). A: *Tetragonisca angustula* B: *Tetragonisca fiebrigi*, C: *Tetragonisca weyrauchi*, mostrando o escapo (E), pedicelo (P) e flagelo (F) subdividido em 10 flagelômeros, respectivamente.

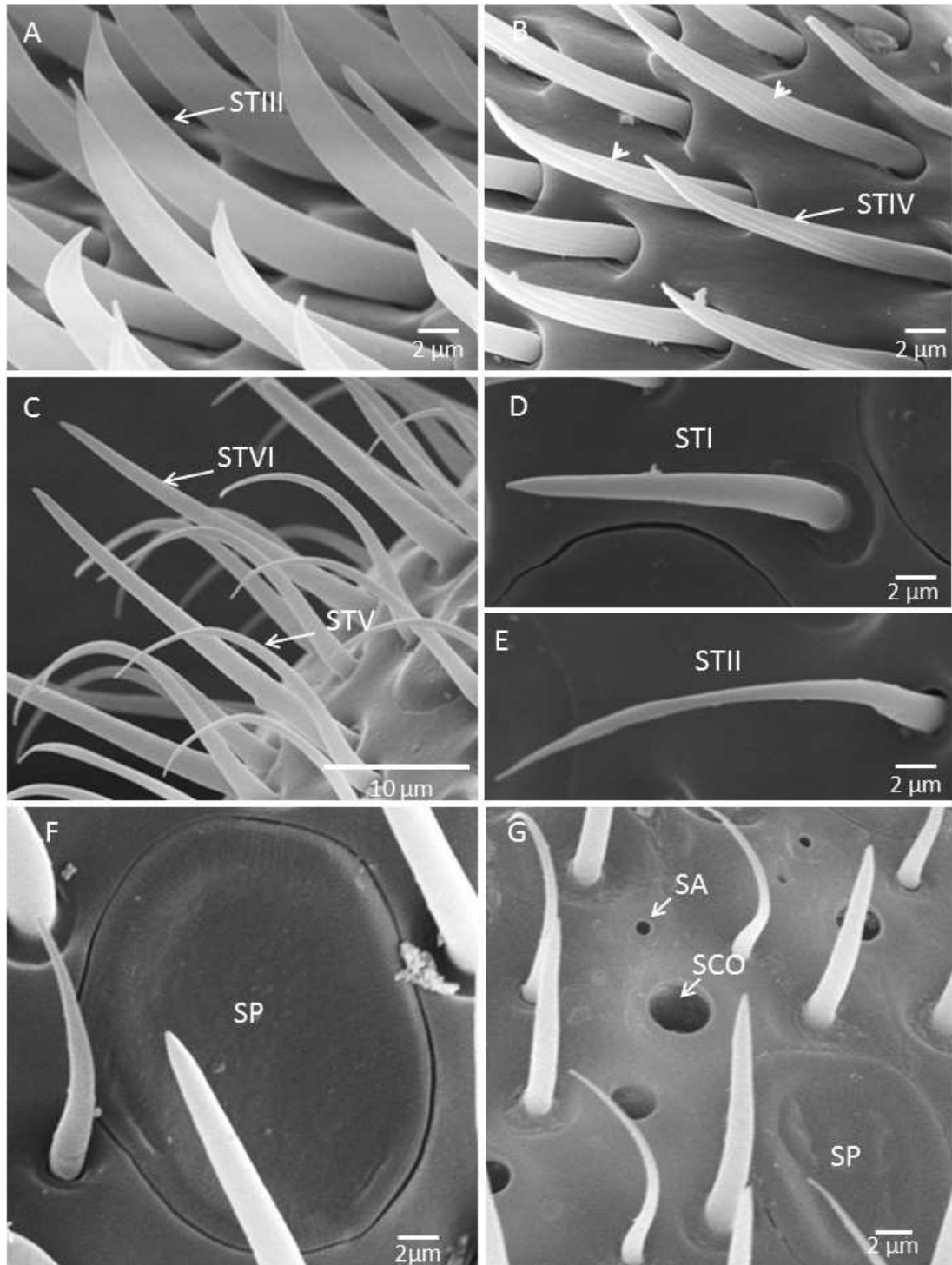


Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando detalhes da superfície dorsal das antenas de operárias *T. weyrauchi*. A: detalhe sensila tricoide III (STIII). B: detalhe da sensila tricoide IV (STIV) com surco longitudinais (ponta da seta). C: detalhe das sensilas tricoide V (STV) e tricoide VI (STVI). D: detalhe da sensila tricoide I (STI). E: detalhe da sensila tricoide II (STII). F: detalhe da sensila placoide (SP). G: detalhe das sensilas celocônica (SCO), ampulácea (SA) e sensila placoide (SP).

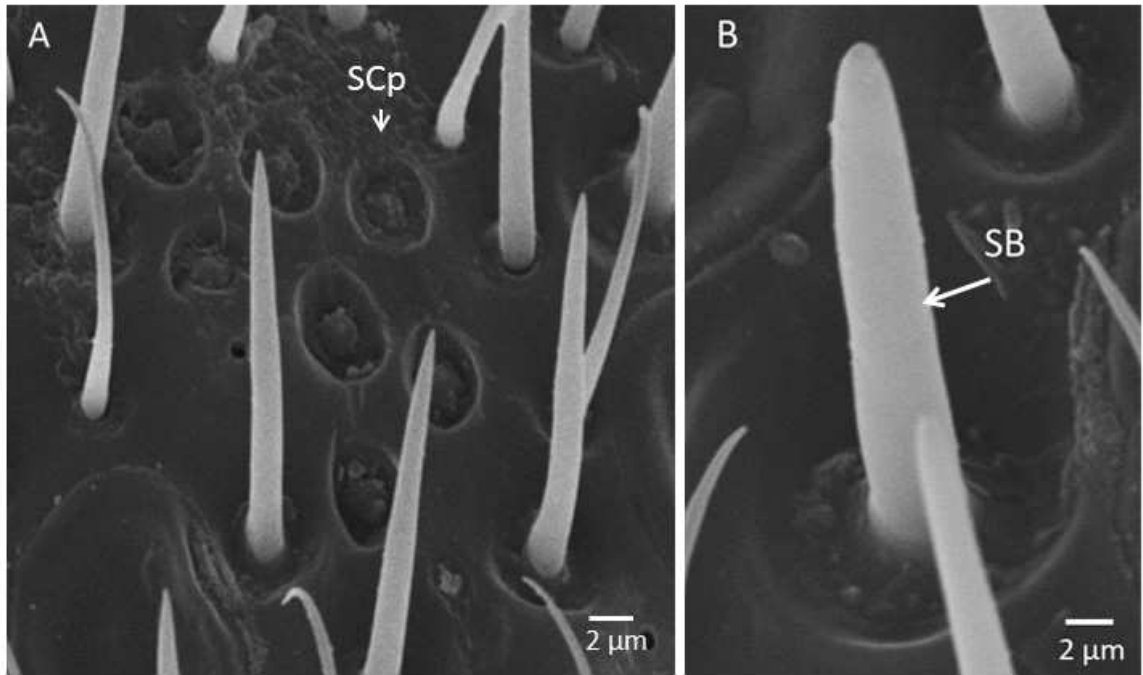


Figura 4. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando detalhes da superfície dorsal das antenas de operárias *T. weyrauchi* **A:** detalhe das sensilas campaniforme (SCp). **B:** detalhe da sensila basicônica (SB).

Tabela 2. Número e Comprimento das sensilas (média e desvio padrão) dos segmentos antenais de operárias de *Tetragonisca weyrauchi*. N: número, C: comprimento.

Caracter	STI	STII	STIII	STIV	STV	STVI	SP	SB	SCp	SCO	SA
N	33.675 (±11.543)	12.55 (±5.717)	3.925 (±11.863)	3.688 (±11.135)	7.063 (±21.325)	3.163 (±9.553)	13.675 (±4.852)	2.25 (±6.802)	0.537 (±1.661)	0.525 (±1.653)	0.2 (±0.604)
C	12.932 (± 1.51)	9.274 (±1.102)	12.949 (±1.677)	16.695 (±1.316)	11.155 (±1.049)	12.417 (±1.165)	14.662 (±1.289)	9.328 (±0.79)	1.161 (±1.15)	0.891 (±0.886)	0.109 (±0.217)

Tabela 3. Distribuição das sensilas nos flagelômeros antenais de operárias adultas de *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*.

Espécie	Flagelômero									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>T. fiebrigi</i>	STIII	STI	STI	STI	STI	STI	STI	STI	STI	STI
	STIV	STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII
										STV
										STVI
		SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
										SB
										SA
										SCO
										SCp
	<i>T. angustula</i>	STIII	STI	STI	STI	STI	STI	STI	STI	STI
STIV		STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII
										STV
										STVI
		SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
										SB
										SA
										SCO
										SCp
<i>T. weyrauchi</i>		STIII	STI	STI	STI	STI	STI	STI	STI	STI
	STIV	STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII	STII
										STV
										STVI
		SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
										SB
										SA
										SCO
										SCp

ST = sensila tricoide (ST subtipos I a VI), SP = sensila placoide, SB = sensila basicônica, SA = sensila ampulacea, SCO = sensilla celocônica, SCp = sensilla campaniforme.

3. Tipos e distribuição de sensilas antenais em *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*

Onze tipos de sensilas foram encontrados na superfície dorsal das antenas, com igual posição nos flagelômeros entre as espécies analisadas (Tabela 3), sendo identificadas como: sensilas tricoides (ST), com seis subtipos: (STI, STII, STIII, STIV, STV, STVI), sensilas placoides (SP), sensilas basicônicas (SB), sensilas campaniformes (SCp), sensilas celocônicas (SCO) e sensilas ampulaceas (SA) (Figs. 5, 6 e 7).

A maior diversidade de sensilas é encontrada no flagelômero dez (extremidade ou ponta da antena) (Tabela 3) com a presença de todos os tipos de sensilas (Fig. 5 F, 6 F, 7 E e 7 F). Sensilas tricoides (ST) e sensilas placoides (SP) são os tipos de sensilas com distribuição mais ampla entre os diferentes flagelômeros (Tabela 3).

Entre os subtipos de sensilas tricoides, as STI são encontradas desde o flagelômero dois até o dez (Figs. 5 A, 5 B, 5 C, 5 F, 6 B, 6 E, 6 F, 7 B e 7 F). As STII ocorrem na metade do primeiro flagelômero (Figs. 5 A, 5 B, 5 E, 5 F, 6 B, 6 F, 7B e 7F), enquanto as STIII e STIV são exclusivas do primeiro flagelômero, com a diferença que as STIV apresentam sulcos longitudinais que são mais notórios em *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi* com relação a *T. angustula* (Figs. 5 A, 5 D, 5 E, 6 A, 6 C, 6 D, 7 A, 7 C e 7 D). As STV e STVI são encontradas no último flagelômero, especificamente no quarto final dele nas três espécies (Figs. 5 F, 6 F e 7 E). As SP apresentam distribuição a partir do segundo flagelômero até flagelômero dez (Figs. 5 A, 5 B, 5 C, 5 F, 6 E, 6 F e 7 F). As SB, SCO, SA e SCp são encontradas exclusivamente no flagelômero dez nas três espécies (Figs. 5 F, 6 F e 7 E).

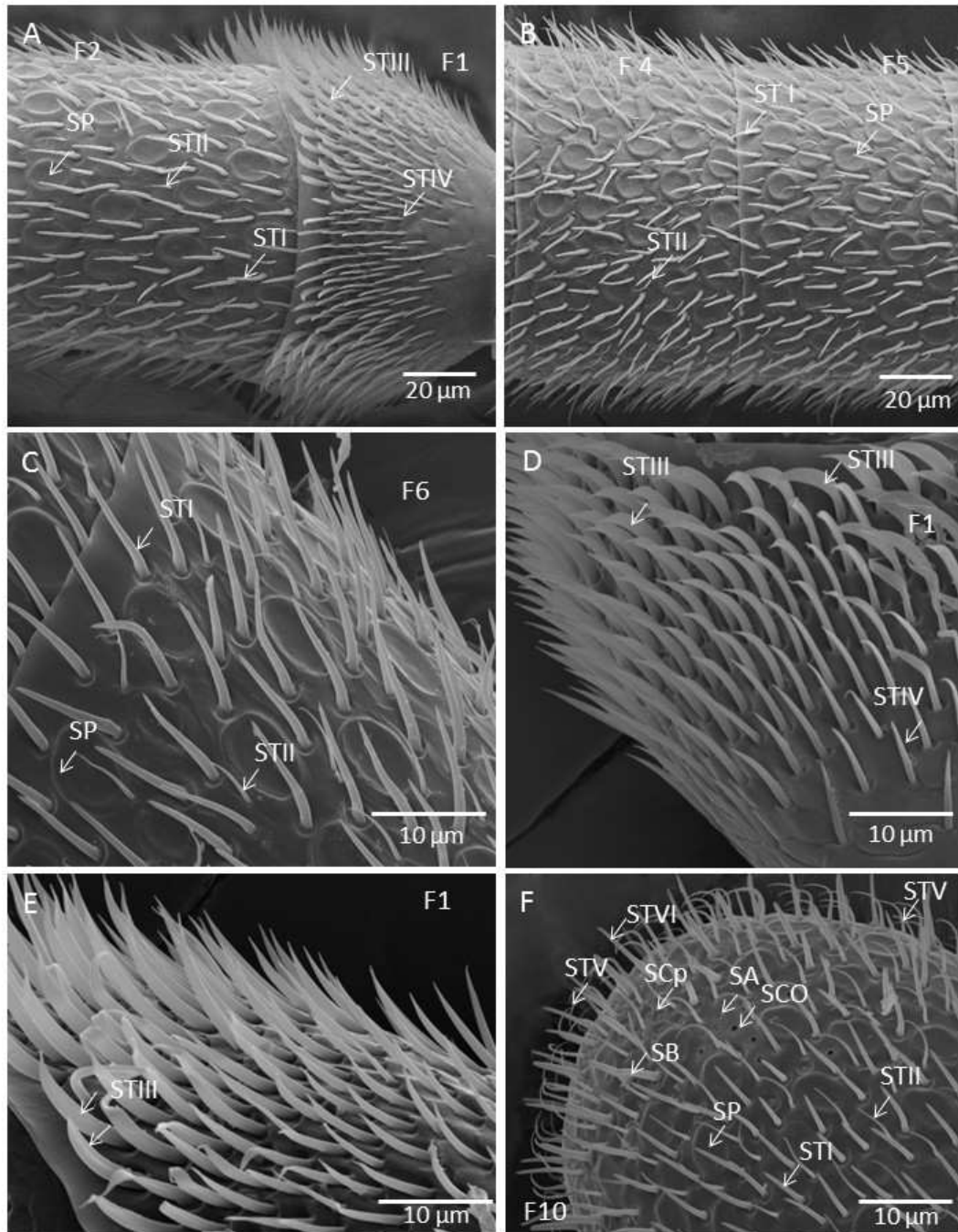


Figura 5. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando detalhes das sensilas antenais em operárias de *T. angustula*. **A:** parte proximal da antena, (F1), com sensilas tricoides dos tipos (STIII) e (STIV) e (F2) com sensila placoide (SP), tricoides (STI e STII). **B:** sensilas tricoides (ST I) e (STII) e sensila placoide (SP) no (F4 e F5). **C:** sensilas tricoides (ST I), (STII) e SP. **D:** sensilas (STIII) e (STIV) no F1. **E:** sensila (STIII). **F:** Flagelômero 10 (F10) com sensilas: STI, STII, STV, STVI, SP, SB, SCp, SCO, SA.

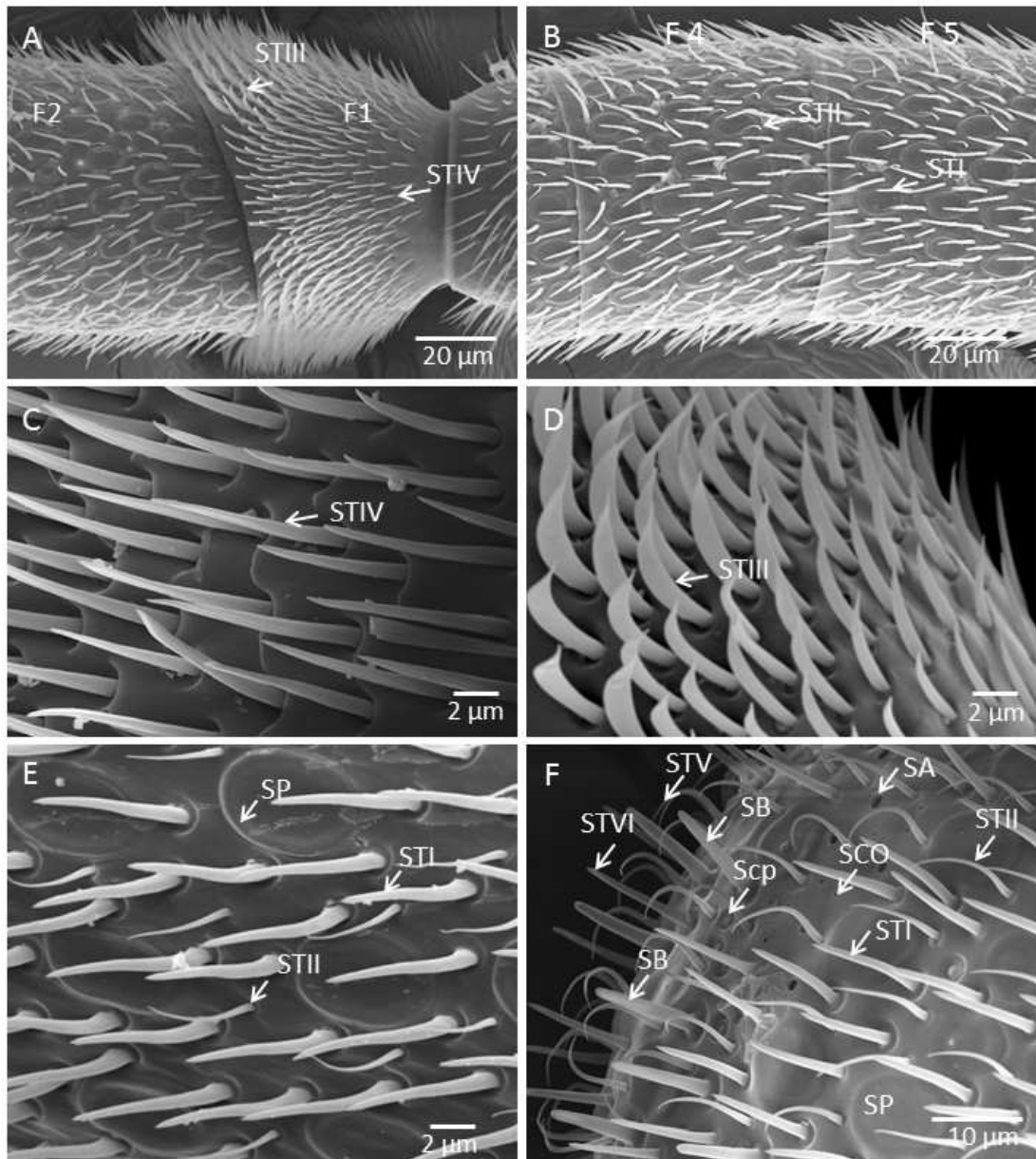


Figura 6. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando detalhes da superfície dorsal da antena de operárias de *T. fiebrigi* **A:** flagelômero 1 e flagelômero 2 sensilas tricoides (STIII) e (STIV). **B:** flagelômero (F4) e (F5) mostrando as sensilas tricoide (STI) e (STII). **C:** flagelômero 1 mostrando as sensilas tricoide IV (STIV). **D:** flagelômero 1 (F1) mostrando as sensilas tricoides (STIII). **E:** flagelômero 8 (F8) mostrando as sensilas placoides (SP), sensilas tricoides (STI) e (STII). **F:** flagelômero 10 (F 10) mostrando as a diversidade de sensilas tricoides STI, STII, STV e STVI, sensilas basicônicas (SB), sensilas celocônicas (SCO), sensilas ampulaceas (SA) e sensilas campaniformes (SCp).

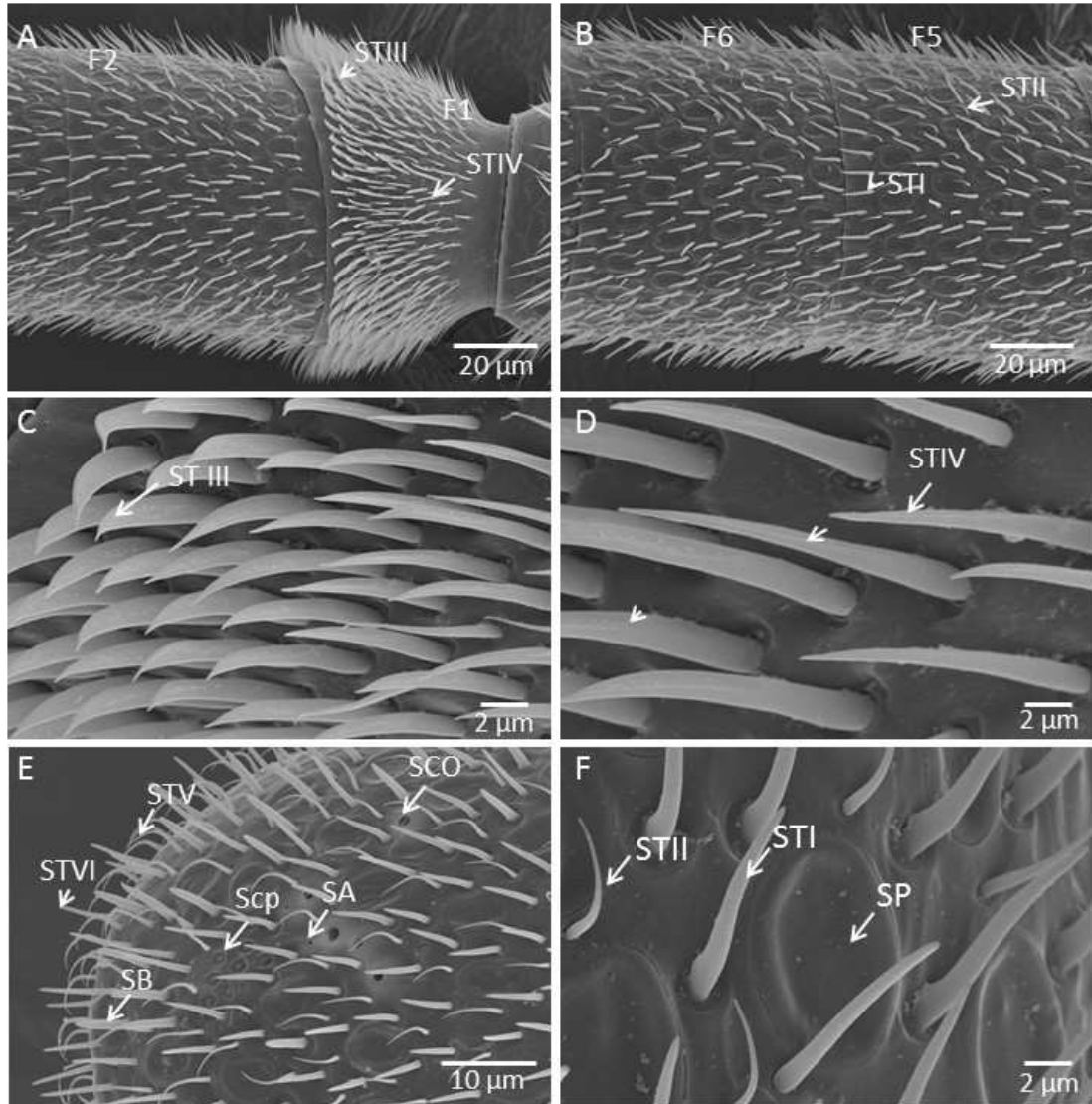


Figura 7. Micrografias eletrônicas de varredura mostrando detalhes da superfície dorsal da antena de operárias de *T. Weyrauchii*. **A:** flagelômero 1 (F1) com sensilas tricoides (STIII) e (STIV). **B:** flagelômero (F5) e (F6) mostrando as sensilas tricoides (STI) e (STII). **C:** detalhe mostrando a sensila tricoide (STIII). **D:** detalhe mostrando as sensila tricoide (STIV). **E:** flagelômero 10 (F 10) mostrando as a diversidade das sensilas tricoides STV e STVI, sensilas basicônicas (SB), sensilas celocônicas (SCO), sensilas ampulaceas (SA) e sensilas campaniformes (SCp). **F:** flagelômero 10 mostrando as sensilas placoides (SP), sensilas tricoides (STI) e (STII).

4. Diferenças morfométricas das sensilas em *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*

De acordo com as diferenças das sensilas com relação a comprimento e número, nas três espécies analisadas, estas podem ser divididas em quatro grupos (Fig. 8; Tabelas 4 e 5): Grupo 1: Formado por sensilas que apresentam diferenças estatisticamente significativas de comprimento entre as três espécies ($p < 0,001$) (Tabela 4), conformado por as sensilas STI, STIII, STIV, SP e SCO (Fig. 8 A). Sendo as STI maiores em *T. angustula* e *T. fiebrigi* e menores em *T. weyrauchi*. Enquanto as sensilas STIII, STIV e SCO são de comprimento maior em *T. weyrauchi*, seguidas por *T. fiebrigi* e menores *T. angustula*. As SP são caracterizadas neste grupo por ter comprimento maior em *T. fiebrigi* e *T. angustula* e menor comprimento em *T. weyrauchi*.

Grupo 2: Formado por sensilas que são semelhantes entre *T. angustula*-*T. fiebrigi* e diferem de *T. weyrauchi* (Tabelas 4 e 5). Neste grupo encontram-se as sensilas STII, SB, Scp pelo comprimento e STI pelo número (Fig. 8 B). O comprimento das STII e SB é maior em *T. angustula* e *T. fiebrigi* e menor em *T. weyrauchi* ($p < 0,001$) (Tabela 4). O comprimento das SCp é maior em *T. weyrauchi* com relação a *T. fiebrigi* e *T. angustula* ($p = 0,006$) (Tabela 4). Enquanto a número as STI são menos abundantes em *T. weyrauchi* em comparação com *T. fiebrigi* e *T. angustula*, que apresentam maior número deste tipo de sensilas (Tabela 5).

Grupo 3: Formado por sensilas que apresentam diferenças estatísticas no comprimento em *T. fiebrigi* ($p < 0,001$) com relação o par de espécies *T. angustula*-*T. weyrauchi* que são semelhantes (Tabela 4). Neste grupo estão presentes as sensilas STVI e SA, sendo maiores as STVI em *T. angustula* e *T. weyrauchi* e menor em *T. fiebrigi*. Enquanto as SA são maiores em *T. fiebrigi* e menores em *T. angustula* e *T. weyrauchi* (Fig. 8 C).

Grupo 4: Formado por sensilas que apresentam diferenças estatísticas no número entre *T. angustula* ($p < 0,001$) e o par de espécies *T. fiebrigi*-*T. weyrauchi* que são semelhantes (Tabela 5). Neste grupo encontram-se as sensilas STII (Fig. 8 C). As STII estão presentes em maior quantidade em *T. angustula* com relação a *T. fiebrigi*-*T. weyrauchi* (Fig. 8 D).

Para as demais sensilas, não foram encontradas diferenças significativas entre as três espécies considerando número e comprimento (Tabelas 4 e 5).

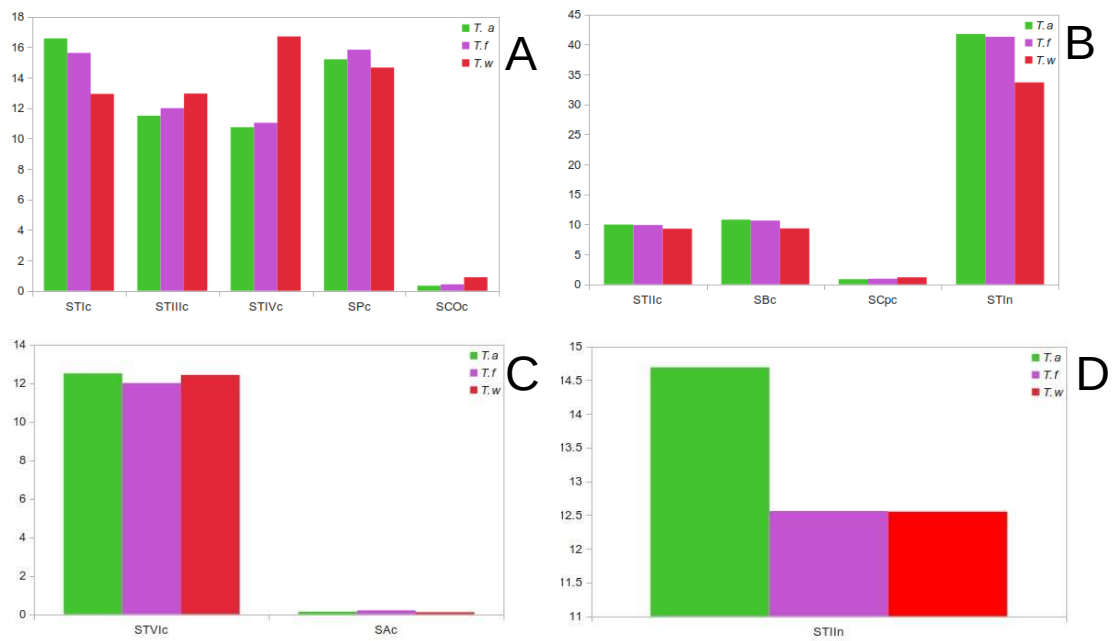


Figura 8. Dados comparativos da média do comprimento (c) e número (n) das sensilas antenais de *T. angustula* (*T.a*), *T. fiebrigi* (*T.f*) e *T. weyrauchi* (*T.w*). **A:** Grupo 1: diferentes tipos de sensilas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas de comprimento (STI, STIII, STIV, SP e SCO) entre as três espécies. **B:** Grupo 2: formado por sensilas que são semelhantes em comprimento (STII, SB, SCp) e número (STI) entre *T. angustula*-*T. fiebrigi* e diferem de *T. weyrauchi*. **C:** Grupo 3: formado por sensilas que apresentam diferenças estatísticas no comprimento em *T. fiebrigi* (STVI e SA), com relação as espécies *T. angustula*-*T. weyrauchi* que são semelhantes. **D:** grupo 4: formado por sensila (STII) que apresentam diferenças estatísticas no número entre *T. angustula* e o par de espécies *T. fiebrigi*-*T. weyrauchi* que são semelhantes.

Tabela 4. Comprimento (media e desvio padrão) das sensilas antenais de operárias adultas de *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*.

Carácter	Espécie	Media	Desvio-padrão	χ^2	Df	P
STI	<i>T. angustula</i>	16.569 a	± 1.741	188.29	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	15.619 b	± 1.715			
	<i>T. weyrauchi</i>	12.932 c	± 1.51			
STII	<i>T. angustula</i>	9.971 a	±1.486	19.53	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	9.885 a	±1.197			
	<i>T. weyrauchi</i>	9.274 b	±1.102			
STIII	<i>T. angustula</i>	11.503 a	±1.899	43.75	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	11.994 b	±1.737			
	<i>T. weyrauchi</i>	12.949 c	±1.677			
STIV	<i>T. angustula</i>	10.735 a	±1.562	216.781	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	11.035 b	±1.84			
	<i>T. weyrauchi</i>	16.695 c	±1.316			
STV	<i>T. angustula</i>	11.287 a	±1.381	2.01	2	0,3661
	<i>T. fiebrigi</i>	11.175 a	±1.256			
	<i>T. weyrauchi</i>	11.155 a	±1.049			
STVI	<i>T. angustula</i>	12.497 a	±1.521	20.211	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	11.997 b	±1.42			
	<i>T. weyrauchi</i>	12.417 a	±1.165			
SP	<i>T. angustula</i>	15.197 a	±1.679	49.95	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	15.829 b	±1.603			
	<i>T. weyrauchi</i>	14.662 c	±1.289			
SB	<i>T. angustula</i>	10.785 a	±1.219	107.345	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	10.631 a	±1.439			
	<i>T. weyrauchi</i>	9.328 b	±0.79			
SCp	<i>T. angustula</i>	0.851 a	±1.04	10.298	2	0.006
	<i>T. fiebrigi</i>	0.933 a	±0.971			
	<i>T. weyrauchi</i>	1.161 b	±1.15			
SCO	<i>T. angustula</i>	0.335 a	±0.489	39.282	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	0.424 b	±0.515			
	<i>T. weyrauchi</i>	0.891 c	±0.886			
SA	<i>T. angustula</i>	0.134 a	±0.224	17.619	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	0.204 b	±0.256			
	<i>T. weyrauchi</i>	0.109 a	±0.217			

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de comparação de medias Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Tabela 5. Número (média e desvio padrão) das sensilas antenais de operárias adultas de *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*.

Carácter	Espécie	Media	Desvio-padrão	χ^2	Df	P
STI	<i>T. angustula</i>	41.743 a	±14.643	121.136	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	41.282 a	±14.373			
	<i>T. weyrauchi</i>	33.675 b	±11.543			
STII	<i>T. angustula</i>	14.69 a	±8.085	22.308	2	< 0,001
	<i>T. fiebrigi</i>	12.557 b	±5.96			
	<i>T. weyrauchi</i>	12.55 b	±5.717			
STIII	<i>T. angustula</i>	6.748 a	±20.475	0.086	2	0.9581
	<i>T. fiebrigi</i>	6.443 a	±19.482			
	<i>T. weyrauchi</i>	3.925 a	±11.863			
STIV	<i>T. angustula</i>	2.329 a	±7.237	0.131	2	0.9368
	<i>T. fiebrigi</i>	1.746 a	±5.383			
	<i>T. weyrauchi</i>	3.688 a	±11.135			
SV	<i>T. angustula</i>	4.805 a	±14.543	0.06	2	0.9703
	<i>T. fiebrigi</i>	4.771 a	±14.21			
	<i>T. weyrauchi</i>	7.063 a	±21.325			
SVI	<i>T. angustula</i>	2.233 a	±6.835	0.083	2	0.9593
	<i>T. fiebrigi</i>	2.361 a	±7.212			
	<i>T. weyrauchi</i>	3.163 a	±9.553			
SP	<i>T. angustula</i>	13.855 a	±5.697	1.675	2	0.4327
	<i>T. fiebrigi</i>	13.793 a	±5.018			
	<i>T. weyrauchi</i>	13.675 a	±4.852			
SB	<i>T. angustula</i>	1.755 a	±5.396	0.048	2	0.976
	<i>T. fiebrigi</i>	1.871 a	±5.735			
	<i>T. weyrauchi</i>	2.25 a	±6.802			
SCp	<i>T. angustula</i>	0.429 a	±1.335	0.05	2	0.9753
	<i>T. fiebrigi</i>	0.532 a	±1.633			
	<i>T. weyrauchi</i>	0.537 a	±1.661			
SCO	<i>T. angustula</i>	0.331 a	±1.1	0.155	2	0.9252
	<i>T. fiebrigi</i>	0.411 a	±1.275			
	<i>T. weyrauchi</i>	0.525 a	±1.653			
SA	<i>T. angustula</i>	0.281 a	±1.037	0.226	2	0.8931
	<i>T. fiebrigi</i>	0.425 a	±1.384			
	<i>T. weyrauchi</i>	0.2 a	±0.604			

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de comparação de medias Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

5. Análise de Componentes Principais (PCA)

Na análise de componentes, os três primeiros eixos reúnem 77,13 % da variação das sensilas no comprimento e número das espécies analisadas (eixo 1: 57,95 %, eixo 2: 11,50 % e eixo 3: 7,68 %) (Tabela 6). Na representação gráfica, a separação completa da espécie *T. weyrauchi* de *T. angustula* e *T. fiebrigi* está bem estabelecida (Fig. 9, 10 e 11), mais as espécies *T. angustula* e *T. fiebrigi* não apresentaram separação completa. No segundo eixo de ordenação, a maior parte das colônias de *T. angustula* e *T. fiebrigi* está relacionada (Fig. 9 e 8), não existindo separação completa, sendo possível observar colônias que se separam das demais como, um primeiro subgrupo de colônias de *T. angustula* provenientes das localidades de Viçosa (colônia 19), Ribeirão Preto (colônias 21, 22 e 23), Coromandel (colônia 30), Mata Fria (colônia 35), Bocaiuva (colônia 36), Brasília (colônias 37, 38) e Taquara (colônia 39) e um segundo subgrupo de colônias de *T. fiebrigi* da localidade de Palotina (colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 11).

6. Análise de agrupamento

A análise de agrupamento com distância de Manhattan mostrou um alto Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) de 0,935. No dendrograma há uma clara diferenciação morfológica entre as colônias de *T. weyrauchi* (conglomerado 1) e um segundo conglomerado (2) (Fig. 12) conformado por colônias de *T. angustula* e *T. fiebrigi*, porém, neste segundo grupo foi possível reconhecer vários subgrupos conformados por colônias de mesma espécie, como *T. angustula* com quatro subgrupos A, B, F e G de colônias provenientes de várias localidades: A [das localidades de Viçosa (colônia 19); Alfredo Chavez (colônia 20) e Ribeirão Preto (colônias 21, 22 e 23)]; B [das localidades de Governador Lindenberg (colônia 25) e Aracati (colônia 29)]; F [da localidade de Lucas do Rio Verde (colônia 31)] e G [das localidades de Mata Fria (colônia 35), Bocaiuva (36), Brasília D.F (colônias 37 e 38) e Taquara (colônia 39)].

Para *T. fiebrigi* há somente um subgrupo E (colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) da localidade de Palotina. Os demais subgrupos têm colônias das duas outras espécies (*T. fiebrigi* e *T. angustula*), sendo os subgrupos C [das localidades de Palotina (colônia 11), Cassilândia (colônia 13), Porto Alegre (colônia 14) Redenção (colônias 26, 27 e 28), Patrocínio (colônia 32), João Herba (colônia 34), Inhai (colônia 33) e Coromandel

(colônia 30)] e subgrupo D [das localidades de Tangara da Serra (colônias 8, 9, 10 e 24) e Porto Alegre (colônia 12)].

7. Análise discriminante (AD)

Na análise discriminante, a matriz de classificação por Jackknife revela que o 87,18% das colônias são reclassificadas como pertencentes às espécies previamente reconhecidas (Tabelas 7 e 8). *T. weyrauchi* se destaca por apresentar 100% de classificação correta de todas as colônias, seguido de *T. fiebrigi* com uma classificação correta de 93% das colônias, com exceção da colônia e14 de Porto Alegre, que é reclassificada como pertencente a *T. angustula*. *T. angustula* tem o menor porcentagem de classificação correta de colônias, estando este valor em 81%, sendo reclassificadas quatro colônias como *T. fiebrigi*, provenientes das localidades de Coromandel, Lucas do Rio Verde, Patrocínio e Brasília (Fig. 13; Tabelas 5 e 6). Das duas funções discriminantes obtidas, a primeira contribuiu com 89,75% da variação e a segunda com 10,26% da variação observada. Traçando as colônias dentro do espaço discriminante definido pelas duas funções discriminantes são os agrupamentos revelados claramente de acordo com a classificação das espécies (Fig. 13).

Tabela 6. Autovalores e variação total dos componentes principais obtidos a partir dos caracteres morfométricos das sensilas de operárias *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*.

PC	Autovalores	% Variância
1	14.3306	57.947
2	2.84443	11.502
3	1.90017	7.6835
4	1.44401	5.839
5	1.05523	4.2669
6	0.877863	3.5497
7	0.584812	2.3647
8	0.430612	1.7412
9	0.345665	1.3977
10	0.223015	0.90178
11	0.201131	0.81329
12	0.156797	0.63402
13	0.106143	0.4292
14	0.0837147	0.33851
15	0.0608032	0.24586
16	0.0387055	0.15651
17	0.0244773	0.098976
18	0.0126689	0.051228
19	0.0064838	0.026218
20	0.00177669	0.0071842
21	0.00091662	0.0037064
22	0.000462066	0.0018684

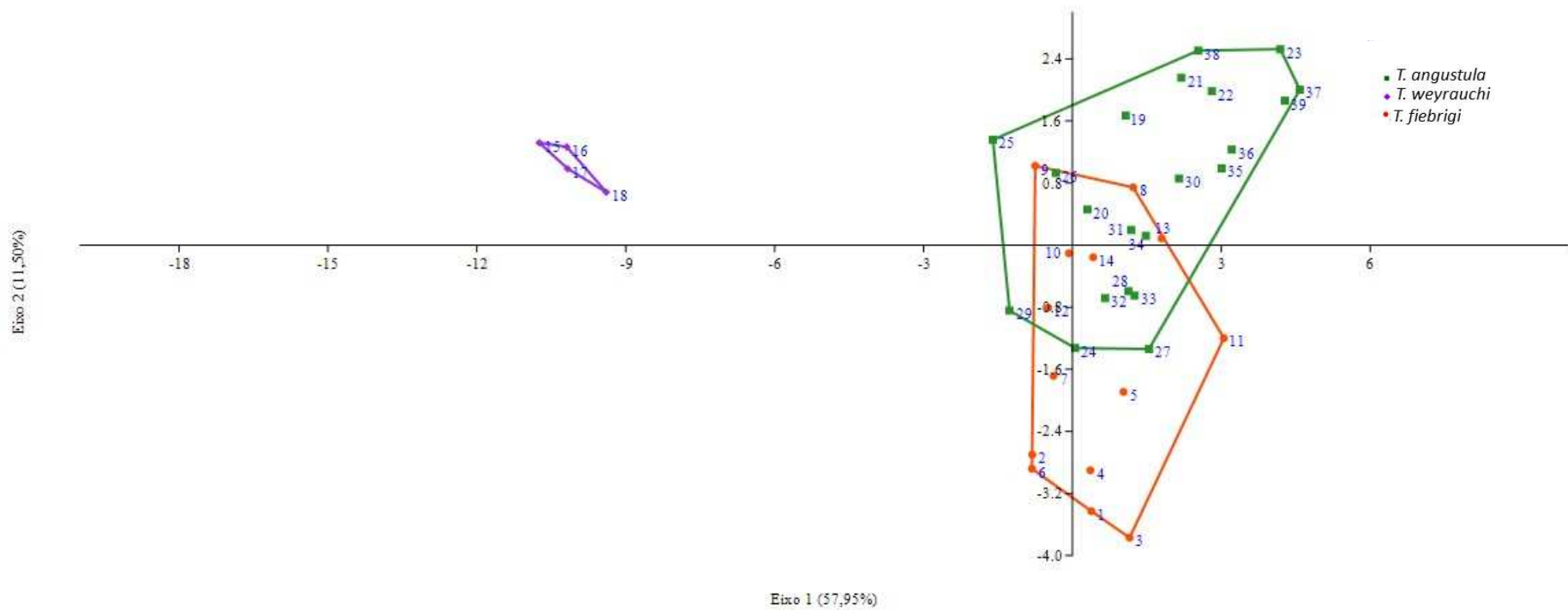


Figura 9. Gráfico de PCA de 21 colônias de *T. angustula*, 14 colônias de *T. fiebrigi* e 4 colônias de *T. weyrauchi* baseado nos caracteres morfométricos das sensilas antenais. Eixos 1 e 2 concentram, respectivamente, 57,94 e 11,50 % da variância total das colônias.

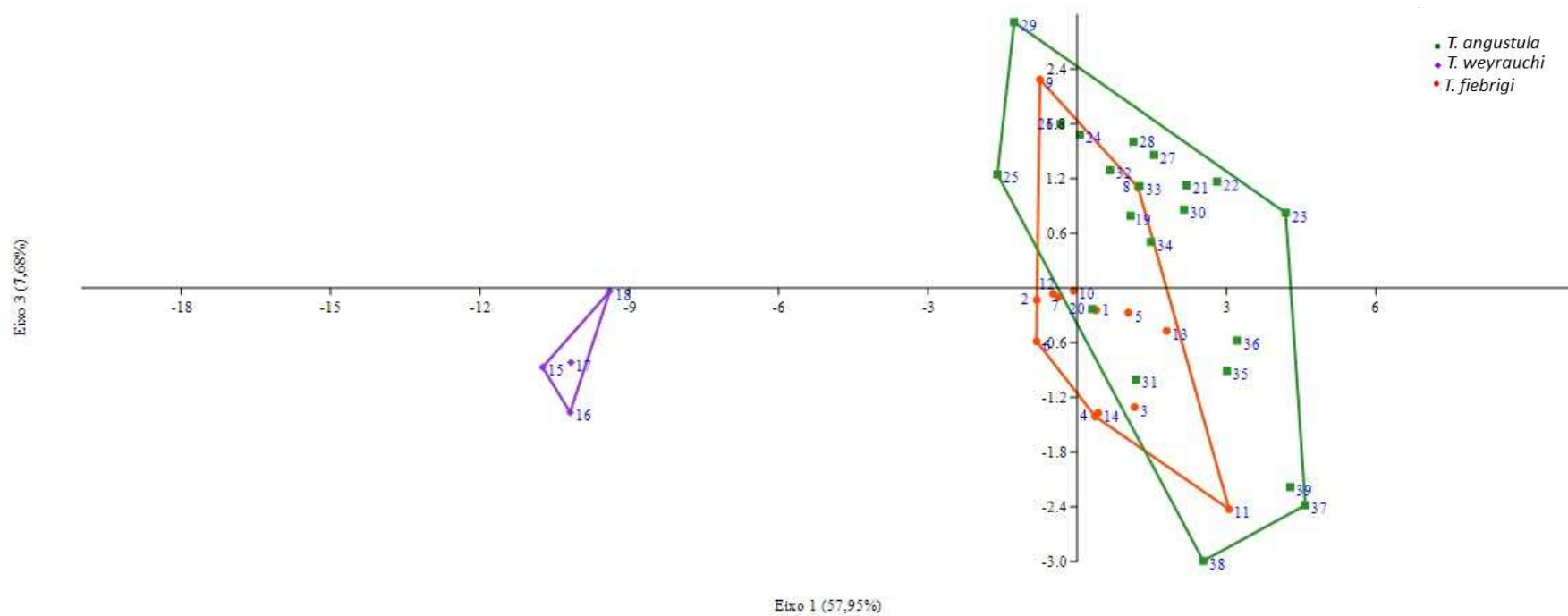


Figura 10. Gráfico de PCA de 21 colônias de *T. angustula*, 14 colônias de *T. fiebrigi* e 4 colônias de *T. weyrauchi* baseado nos caracteres morfométricos das sensilas antenais. Eixos 1 e 3 concentram, respectivamente, 57,94 e 7,68 % da variância total das colônias.

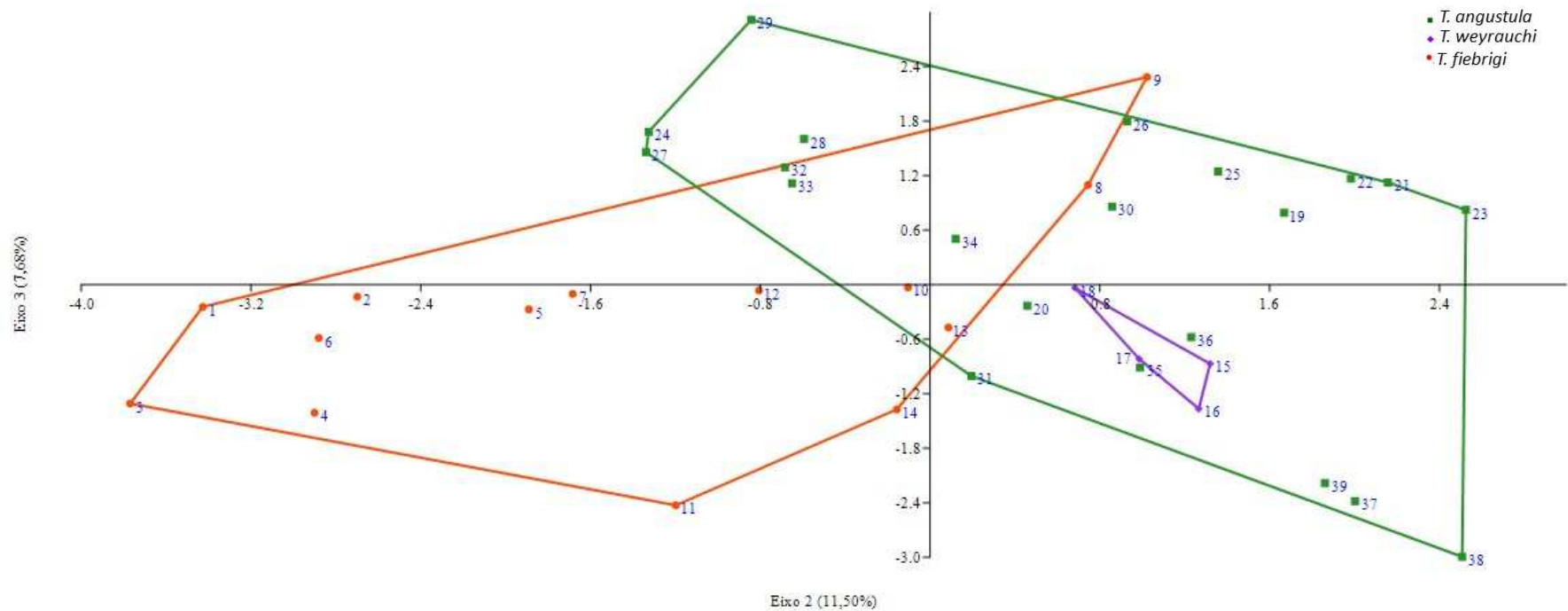


Figura 11. Gráfico de PCA de 21 colônias de *T. angustula*, 14 colônias de *T. fiebrigi* e 4 colônias de *T. weyrauchi* baseado nos caracteres morfométricos das sensilas antenais. Eixos 2 e 3 concentram, respectivamente, 11,50 e 7,68 % da variância total das colônias.

Tabela 7. Matriz de classificação das colônias de *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi*.

Colônias	Grupos a priori	Classificação	Jackknifed
1 <i>T. f</i>	1	1	1
2 <i>T. f</i>	1	1	1
3 <i>T. f</i>	1	1	1
4 <i>T. f</i>	1	1	1
5 <i>T. f</i>	1	1	1
6 <i>T. f</i>	1	1	1
7 <i>T. f</i>	1	1	1
8 <i>T. f</i>	1	1	1
9 <i>T. f</i>	1	1	1
10 <i>T. f</i>	1	1	1
11 <i>T. f</i>	1	1	1
12 <i>T. f</i>	1	1	1
13 <i>T. f</i>	1	1	1
14 <i>T. f</i>	1	1	3
15 <i>T. w</i>	2	2	2
16 <i>T. w</i>	2	2	2
17 <i>T. w</i>	2	2	2
18 <i>T. w</i>	2	2	2
19 <i>T. a</i>	3	3	3
20 <i>T. a</i>	3	3	3
21 <i>T. a</i>	3	3	3
22 <i>T. a</i>	3	3	3
23 <i>T. a</i>	3	3	3
24 <i>T. a</i>	3	3	3
25 <i>T. a</i>	3	3	3
26 <i>T. a</i>	3	3	3
27 <i>T. a</i>	3	3	3
28 <i>T. a</i>	3	3	3
29 <i>T. a</i>	3	3	3
30 <i>T. a</i>	3	3	1
31 <i>T. a</i>	3	3	1
32 <i>T. a</i>	3	3	1
33 <i>T. a</i>	3	3	3
34 <i>T. a</i>	3	3	3
35 <i>T. a</i>	3	3	3
36 <i>T. a</i>	3	3	3
37 <i>T. a</i>	3	3	3
38 <i>T. a</i>	3	3	1
39 <i>T. a</i>	3	3	3

Tabela 8. Resultados da matriz de classificação gerada pela Análise Discriminante, utilizando o método de Jackknife.

Grupos reconhecidos a priori	<i>T. fiebrigi</i>	<i>T. weyrauchi</i>	<i>T. angustula</i>	Agrupamentos corretos (%)
<i>T. fiebrigi</i>	13	0	1	92,85
<i>T. weyrauchi</i>	0	4	0	100
<i>T. angustula</i>	4	0	17	80,9
Total	17	4	18	87,18

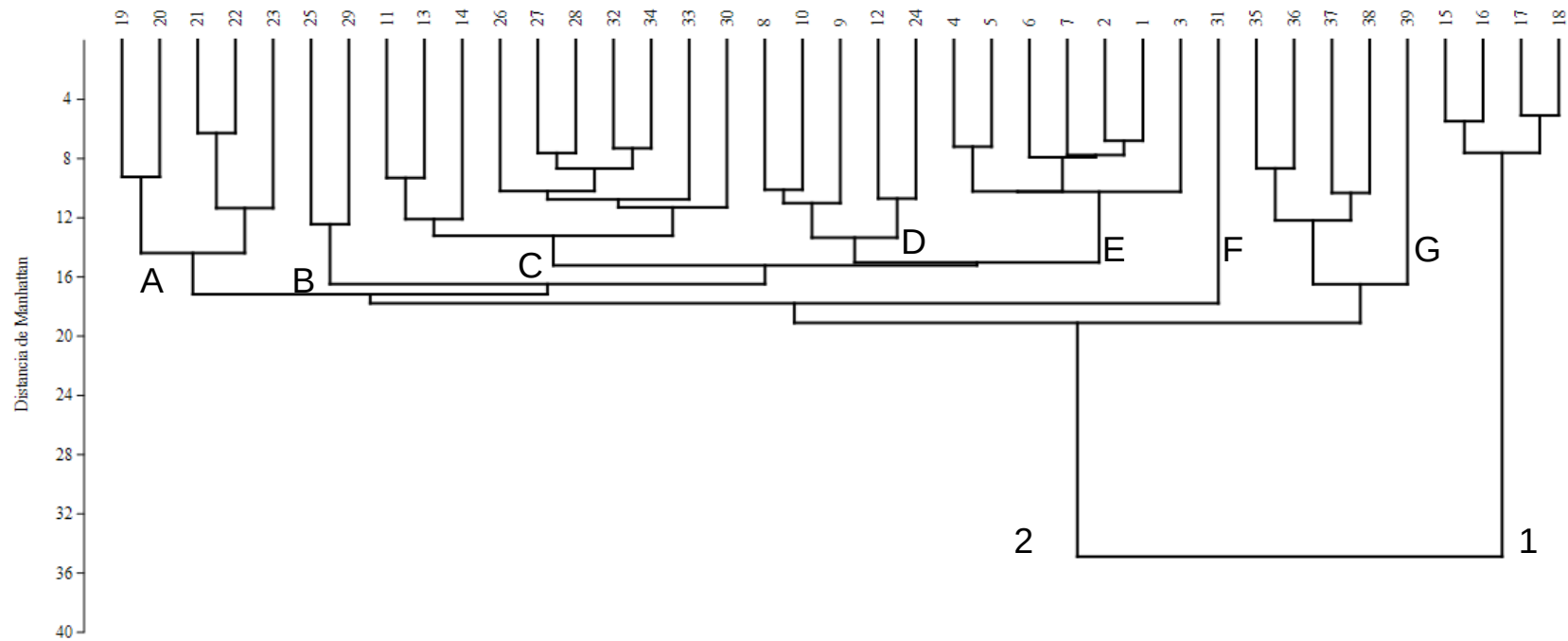


Figura 12. Dendrograma de UPGMA de 21 colônias de *T. angustula*, 14 colônias de *T. fiebrigi* e 4 colônias de *T. weyrauchi*, baseado em caracteres morfométricos das sensilas antenais, utilizando distância de Manhattan. Coeficiente Correlação Cofenética = 0,935. Grupo 1 corresponde as colônias de *T. weyrauchi* e grupo 2 as colônias das *T. angustula* e *T. fiebrigi*. As letras corresponde aos diferentes subgrupos de colônias de *T. angustula* e *T. fiebrigi*. Os números representam o número da colônia.

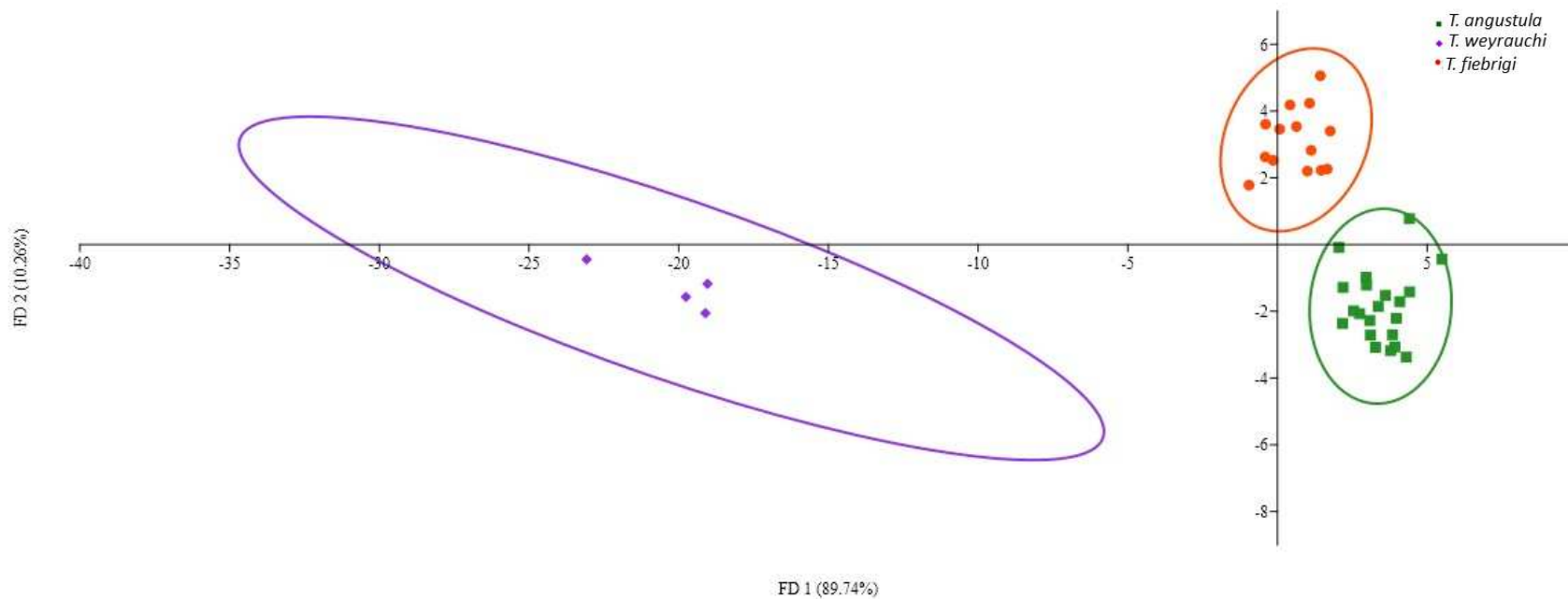


Figura 13. Análise discriminante de 21 colônias de *T. angustula*, 14 colônias de *T. fiebrigi* e 4 colônias de *T. weyrauchi*, baseado nos caracteres morfométricos das sensilas antenais representados nos eixos canônicos (FD 1: Função discriminante 1 e FD 2: Função discriminante 2).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi apresentado, pela primeira vez, a morfologia comparativa das sensilas antenais de três espécies do gênero *Tetragonisca*: *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi* e, também os tipos de sensilas presentes de *T. weyrauchi*, espécies evolutivamente próximas (Rasmussen & Cameron, 2009). Os resultados mostram que a organização dos segmentos das antenas, nas operárias das três espécies é semelhantes às antenas de outras abelhas eussociais (Esslen & Kaissling, 1976; Ravaiano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017; Fialho *et al.*, 2014), apresentando um escapo, um pedicelo e dez segmentos flagelares.

No dorso destes segmentos foram caracterizados 11 tipos de sensilas, com o mesmo tipo e distribuição nos flagelômeros entre as espécies analisadas, resultados que corroboram com o observado em operárias de *T. fiebrigi* (Juris *et al.*, submetido). Esta semelhança nos tipos e distribuição das sensilas nas abelhas do gênero *Tetragonisca* poderia estar relacionada por serem espécies próximas (Rasmussen & Cameron, 2009), o que nos indica que as características das sensilas podem ser semelhantes entre espécies de mesmo gênero (Valuyskiy *et al.*, 2017). Resultado similar foi encontrado em operárias de abelhas sem ferrão (Meliponini), nas quais as diferenças entre as ocorrências de tipos de sensilas foram maiores entre os gêneros do que nas espécies do mesmo gênero (Fialho *et al.*, 2014). Porém os resultados diferem ao encontrado em *T. angustula*, que não apresenta todos os tipos de sensilas, devido à ausência das sensilas ampulaceas e as diferenças na distribuição das sensilas nos flagelômeros (Fialho *et al.*, 2014). A maioria dos tipos de sensilas antenais encontrados em *Tetragonisca* também ocorrem em outras abelhas sem ferrão (Fialho *et al.*, 2014; Ravaiano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017), sugerindo que os tipos de sensilas são conservados entre as Meliponini.

Sensilas tricoides e placoides são os tipos de sensilas com maior abundância nas três espécies analisadas, como foi relatado para *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *M. scutellaris* (Frasnelli *et al.*, 2010; Ravaiano *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017). Esses tipos de sensilas estão associados a funções quimiorreceptoras para a percepção de feromônios e semioquímicos voláteis (Schneider, 1964; Keil, 1997; Hu *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011). No entanto, outra fonte de dados mostra que sensilas com uma estrutura semelhante às sensilas tricoide têm funções mecanorreceptoras (Ågren & Hallberg, 1996; Mißbach *et al.*, 2011), possivelmente essas funções podem estar

presentes nas sensilas tricoides, devido à variabilidade encontrada para estas sensilas, divididas em seis subtipos nas três espécies analisadas deste gênero, resultados que concordam com os subtipos presentes em *M. quadrifasciata* (Ravaiano *et al.*, 2014). Porém, diferem de outras Meliponini, como por exemplo, *M. scutellaris* (Carvalho *et al.*, 2017), que apresentam dois tipos de sensilas tricoides.

Operárias de *T. weyrauchi* apresentam maior diversidade dos tipos de sensilas no flagelômero dez, em comparação a outros flagelômeros, diversidade que também está presente no flagelômero das operárias de *T. fiebrigi* (Juris *et al.*, submetido) e de *T. angustula* analisadas neste estudo. No entanto, esta diversidade foi encontrada nos flagelômeros nove e dez de operárias de *T. angustula* (Fialho *et al.*, 2014). A alta diversidade dos tipos de sensilas nos flagelômeros distais pode ter evoluído para facilitar a comunicação entre a rainha e operárias dentro da colônia, durante os processos de provisionamento e oviposição (POP) (Sakagami & Oniki, 1963) uma vez que essa é a parte antenal mais exposta.

As sensilas antenais apresentam variações no comprimento e abundância, nas três espécies, sendo mais pronunciadas as diferenças encontradas em *T. weyrauchi*. A espécie *T. weyrauchi* apresentou menor comprimento das sensilas STI, STII, SP e SB e menor abundância das STI quando comparada com as espécies *T. fiebrigi* e *T. angustula*. Estas sensilas têm sido reportadas com função olfatória e quimiorreceptora (Snodgrass, 1956; Shanbhag *et al.*, 1999). Mesmo assim, a espécie *T. weyrauchi* apresentou maior comprimento nas sensilas SCO, SCp, STIII e STIV, diferentemente das outras duas espécies, nas quais as sensilas foram mais curtas.

As SCO e SCp foram associadas com funções termorreceptoras, detectores de umidade e concentração de CO₂ (Kuwabara & Takeda, 1956; Reborá *et al.*, 2007; Dietz & Humphreys, 1971; Must *et al.*, 2006). Estas características sugerem que *T. weyrauchi* precisa de maior diâmetro destes últimos tipos de sensilas para detectar a temperatura de maneira mais eficiente, dentro de seus ninhos (Wilson, 1971) e regulá-la, pois esta espécie encontrada em regiões de alta temperatura durante o ano todo, nos estados brasileiros de Rondônia, Acre e Mato Grosso.

Enquanto as STIII e STIV em *T. weyrauchi* possivelmente estão associadas a funções mecanorreceptoras, um maior comprimento destas poderia facilitar a capacidade de movimento, por se localizar no primeiro flagelômero da antena, próximo ao pedicelo, sendo proprioceptora, de maneira a auxiliar na percepção da posição da antena em relação cabeça, como descrito em outros himenópteros

(Ochieng *et al.*, 2000). Estes tipos de sensilas também estão presentes na mesma posição em *M. quadrifasciata* (Ravaiano *et al.*, 2014).

O comprimento das sensilas STII, SB e SCp e a abundância de STI nas espécies *T. angustula* e *T. fiebrigi*, são semelhanças morfológicas observadas nestas espécies. Porém diferenças no comprimento das STI, STII, STIV, STVI, SP, SCO e SA entre as duas espécies sugerem que podem ser espécies de separação filogenética recente (Francisco *et al.*, 2014), que ainda conservam caracteres ancestrais.

Ao observar as diferenças entre as espécies *T. angustula* e *T. fiebrigi* é evidente que o tamanho da maioria das sensilas de *T. fiebrigi* é maior (STIII, STIV, SP, SCO e SA). Estes tipos de sensilas estão envolvidas na recepção de feromônios e semioquímicos voláteis, detectores de temperatura e umidade (Keil, 1997; Kuwabara & Takeda, 1956; Reborá *et al.*, 2007). Um maior comprimento destas sensilas poderia aumentar a sensibilidade olfativa durante o forrageio e melhorar a percepção dos fatores abióticos, como a temperatura, a umidade relativa e a velocidade do vento ou mesmo a fatores internos da colônia.

A temperatura é um dos fatores que mais influencia a atividade de forrageamento das abelhas (Hilário *et al.*, 2012). *T. fiebrigi* apresenta atividade de forrageio entre 18°C e 35°C (Kaehler, 2017), portanto com maior amplitude do que sua espécie irmã, *T. angustula*, para a qual foi evidenciada que a temperatura ideal para o forrageio está entre 20°C e 30°C (Iwama, 1977). Em algumas espécies de abelhas sem ferrão a umidade relativa do ar influencia a atividade de forrageio, para *T. fiebrigi* a umidade ideal está entre 70 e 90% e *T. angustula* forrageia sob condições de umidade entre 30 e 70% (Iwama, 1977), sendo esta diferença com a espécie-irmã possivelmente devido ao fato de que cada espécie depende de condições climáticas específicas (Corbet *et al.*, 1993). Essas diferenças poderiam contribuir na diferenciação das sensilas entre as espécies.

Os resultados das análises multivariadas PCA demonstraram que existe um padrão de variação nos caracteres morfométricos entre as três espécies de *Tetragonisca*. O maior número de diferenças está presente em *T. weyrauchi* quando comparada a *T. angustula* e *T. fiebrigi*, sendo as duas últimas mais similares, porém, as diferenças encontradas não excluem que *T. angustula* e *T. fiebrigi* sejam entidades similares, nas quais ainda podem ter fluxo gênico e as diferenças taxonômicas observadas sejam produto da plasticidade fenotípica, sendo espécies que não estão bem estabelecidas (Francisco *et al.*, 2014).

As análises de PCA também foram utilizadas para estabelecer diferenças morfométricas nas asas anteriores das espécies deste gênero, sendo *T. weyrauchi* a espécie com maior divergência nestes caracteres (Sampaio *et al.*, submetido). As diferenças para esta espécie pode ser reflexo da distribuição geográfica em regiões que oferecem pressões ambientais muito diferentes (Francoy *et al.*, 2011).

Similarmente, aos resultados encontrados no PCA e na análise de agrupamento, foi possível diferenciar a espécie *T. weyrauchi* das espécies *T. angustula* e *T. fiebrigi*. Esta diferenciação ocorreu com um alto valor de Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) que permitiu observar a formação de grupos discretos só da espécie *T. angustula* (subgrupos A, B, F e G) e *T. fiebrigi* (subgrupo E), além de grupos mistos no centro do conglomerado, que correspondem a colônias de *T. angustula* e *T. fiebrigi* (subgrupos C e D). A separação encontrada poderia estar relacionada ao fato de que *T. angustula* e *T. fiebrigi* apresentam distribuição simpátrica (Castanheira & Contel, 1995) e que possivelmente está ocorrendo hibridação entre duas espécies (Francisco *et al.*, 2014).

Os caracteres morfométricos das asas em *Tetragonisca* também permitiram diferenciar *T. weyrauchi* de *T. angustula* e *T. fiebrigi* (Sampaio *et al.*, submetido), mostrando que as variações fenotípicas encontradas na estrutura antenal não são as únicas a diferenciar as espécies. Contrariamente, em outros estudos de morfologia com populações de *T. angustula*, foram encontrados baixos CCC e nenhuma estrutura geográfica, demonstrando que de alguma forma, esta espécie deve manter algum nível de fluxo gênico (Diniz-Filho *et al.*, 1998).

A AD permitiu estabelecer que a classificação taxonômica de *T. weyrauchi* está dentro de um padrão diferente ao observado para as outras espécies. O resultado da morfologia evidencia alta variação, ou seja, nenhuma das amostras dos ninhos para esta espécie foi reclassificada como de outra espécie. Para as outras duas espécies, alguns ninhos foram reclassificados, isso leva a pensar que as características da morfologia das sensilas em *T. angustula* e *T. fiebrigi* não são tão discriminantes, para serem utilizados ao nível de ferramenta diagnóstica na taxonomia do gênero. Além disso, tem sido mostrado que estas duas espécies foram elevadas recentemente a categoria de espécies, e ferramentas moleculares mostram que o isolamento reprodutivo é incompleto. De uma forma ou outra, os resultados apresentam um possível complexo de espécies, no qual a utilização conjunta de ferramentas de caracterização morfológica e moleculares, como sequências de DNA, poderiam

estabelecer de forma definitiva a categoria taxonômica na qual devem ser catalogadas as espécies.

CONCLUSÕES

Neste estudo foi caracterizada, pela primeira vez, a morfologia das sensilas do dorso das antenas de operárias *T. weyrauchi*, mostrando semelhanças nos tipos e distribuição destas estruturas em relação a *T. angustula* e *T. fiebrigi*, indicando que a morfologia e distribuição das sensilas é conservada entre espécies próximas, como as espécies do gênero *Tetragonisca*.

As análises univariadas e multivariadas dos caracteres morfométricos das sensilas antenais revelaram que existem variações entre as três espécies do gênero *Tetragonisca*, mostrando maiores diferenças em *T. weyrauchi* com relação a *T. angustula* e *T. fiebrigi*, que recentemente divergiram para este gênero.

Os resultados robustecem as sugestões que existem espécies no grupo *Tetragonisca* que não são geneticamente homogêneas e a existência de complexos de espécies para o gênero, onde os grandes grupos *T. fiebrigi* e *T. angustula* apresentam-se morfologicamente semelhantes, mas geneticamente diferentes.

REFERÊNCIAS

- Ågren, L. & Svensson, B.G. (1982). Flagellar sensilla of *Sphcodes* bees (Hymenoptera, Halictidae). *Zoologica Scripta*. **11**, 45–54.
- Ågren L. & Hallberg E. (1996). Flagellar sensilla of bumble bee males (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*). *Apidologie*. **27**, 433–444.
- Barlin, M.R. & Vinson, S.B. (1981). The multiporous plate sensillum and its potential use in braconid systematics (Hymenoptera: Braconidae). *The Canadian Entomologist*. **113**, 931–938.
- Camargo, J.M.F. & Pedro S.R.M. (2007). *Meliponini Lepeletier*, 1836, p. 272–578. In: J.S. Moure, D. Urban & G.A.R. Melo (Orgs.). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, p.1058.
- Camargo J.M.F. & Pedro, S.R.M. (2008). Revisão das espécies de *Melipona* do grupo *fuliginosa* (Hymenoptera, Apoidea, Apidae, Meliponini). *Revista Brasileira de Entomologia*. **52**, 411–427.
- Camargo J.M.F. & Pedro S.R.M. (2013). *Meliponini Lepeletier*, 1836. In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs.). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* online version. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>.
- Campos, D.D. (2016). Análise morfológica das sensilas antenais das abelhas *Melipona interrupta* Latreille, 1811 e *Melipona seminigra* Friese, 1903.
- Castanheira, E.B. & Contel, E.P. (1995). Isoenzymes related to flight activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae): Evidence of posttranslational modification of the hexokinase and detection of new glycerol-3-phosphate dehydrogenase variants. *Biochemical genetics*. **33**, 365–375.
- Chapman, R. F. (1982). Chemoreception: The significance of receptor numbers. *Advances in insect physiology*. **16**, 247–356.
- Chapman R.F., Simpson S.J. & Douglas A.E. (2013). *The Insects: Structure and Function*. New York, Cambridge University Press.
- Carvalho, W.J., Fujimura, P.T., Bonetti, A.M., Goulart, L.R., Cloonan, K., da Silva, N.M., Araújo, E.C.B., Ueira-Vieira, C. & Leal, W.S. (2017). Characterization of antennal sensilla, larvae morphology and olfactory genes of *Melipona scutellaris* stingless bee. *PLoS One*. **12**, e0174857.

- Chen, H.-H., Zhao, Y.-X. & Kang, L. (2003). Antennal sensilla of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) in relation to food preferences and habits. *Journal of biosciences*. **28**, 743–752.
- Cortopassi-Laurino, M. & Nogueira-Neto, P. (2003). Notes on the bionomy of the stingless bee *Tetragonisca weyrauchi* Schwarz, 1943 (Apidae, Meliponini). *Acta Amazonica*. **33**, 643–650.
- Corbet, S.A., Fussell, M., Ake, R., Fraser, A., Gunson, C., Savage, A. & Smith, K. (1993). Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecological entomology*. **18**, 17–30.
- Dietz, A. & Humphreys, W.J. (1971). Scanning electron microscopic studies of antennal receptors of the worker honey bee, including sensilla campaniformia. *Annals of the Entomological Society of America*. **64**, 919–925.
- Diniz-Filho, J.A.F., Balestra, R., Rodrigues, F.M. & De Araujo, E. D. (1998). Geographic variation of *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Meliponinae) in central and southeastern Brazil. *Naturalia- São Paulo*. **23**, 193–208.
- Esslen, J. & Kaissling, K.E. (1976). Zahl und Verteilung antennaler Sensillen bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie*. **83**, 227–251.
- Faucheux, M.J., Kristensen, N.P. & Yen, S.H. (2006). The antennae of neopseustida moths: Morphology and phylogenetic implications, with special reference to the sensilla (Insecta, Lepidoptera, Neopseustidae). *Zool. Anzeiger*. **245**, 131–142.
- Fialho M.C.Q., Guss-Matiello C.P., Zanuncio J.C., Campos L.A.O. & Serrão J.E. (2014). A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. *Journal of Apicultural Research*. **53**, 392–403.
- Francisco, F.O., Santiago, L.R., Brito, R.M., Oldroyd, B.P., & Arias, M.C. (2014). Hybridization and asymmetric introgression between *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi*. *Apidologie*. **45**, 1–9.
- Francisco, F. O., Santiago, L. R., Mizusawa, Y. M., Oldroyd, B. P. & Arias, M. C. (2017). Population structuring of the ubiquitous stingless bee *Tetragonisca angustula* in southern Brazil as revealed by microsatellite and mitochondrial markers. *Insect Science*. **24**, 877–890.
- Frasnelli E., Anfora G., Trona F., Tessarolo F. & Vallortigara G. (2010). Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavior Brain Research*. **209**, 221–225.

- Francoy, T.M, Rancoy, T.M, Franco, F.F, & Roubik, D. W. (2012) Integrated Landmark and outline-based morphometric methods efficiently distinguish species of *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie*. **43**, 609–617.
- González-Vaquero, R.A. & Galvani, G.L. (2016). Antennal sensilla analyses as useful tools in the revision of the sweat-bee subgenus *Corynura* (*Callistochlora*).
- Hammer, O., Harper, D.A.T. & Rian, P.D. (2016). Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis: version. 1.37. 2011.
- Hilário, S.D., Imperatriz-Fonseca, V. L. & Kleinert, A.D.M.P. (2001). Responses to climatic factors by foragers of *Plebeia pugnax* Moure (in litt.)(Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Biologia*. **61**,191–196.
- Hu, F., Zhang, G. N. & Wang, J. J. (2009). Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae). *Micron*. **40**, 320–326.
- Iwama S. (1977) Coleta de alimentos e qualidade do mel de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae).
- Jamovi project. (2018). jamovi (Version 0.9) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.
- Kaehler, T. G. (2017). Forrageio de operárias de *Tetragonisca fiebrigi* (Apidae; Meliponini): potencial de obtenção de recursos e polinização.
- Keil T.A. (1997). Comparative morphogenesis of sensilla: a review. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. **26**, 151–160.
- Kuwabara, M. & Takeda, K. (1956). On the hygroreceptor of the honey bee *Apis mellifera*. *Physiology and Ecology*. **7**, 1–6.
- Melnitsky, S.I., Ivanov, V.D., Valuyskiy, M.Y., Zueva, L.V. & Zhukovskaya, M. I. (2018). Comparison of sensory structures on the antenna of different species of *Philopotamidae* (Insecta: Trichoptera). *Arthropod structure & development*. **47**, 45–55.
- Mißbach C., Harzsch S. & Hansson B.S. (2011). New insights into an ancient insect nose: the olfactory pathway of *Lepismachilis y-signata* (Archaeognatha: Machilidae). *Arthropod Structure & Development*. **40**, 317–333.
- Moure, J.S., Melo, G.A.R. & Faria, J.R.R.R. (2007). *Euglossini Latreille, 1802*. Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba. p.214–255.

- Must, A., Merivee, E., Mand, M., Luik, A. & Heidema, M. (2006). Electrophysiological responses of the antennal campaniform sensilla to rapid changes of temperature in the ground beetles *Pterostichus oblongopunctatus* and *Poecilus cupreus* (Tribe Pterostichini) with different ecological preferences. *Physiological Entomology*. **31**, 278–285.
- Nascimento, M.A., Salomão, T.M.F. & Martins, G. (2013). Estudo comparativo das sensilas antenais de operárias de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Apidae) de diferentes altitudes. *EntomoBrasilis*. **6**, 64–67.
- Ochieng, S.A., Park, K. C., Zhu, J. W. & Baker, T.C. (2000). Functional morphology of antennal chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Arthropod structure & development*. **29**, 231–240.
- Rasmussen, C. & Cameron, S.A. (2009). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*. **99**, 206–232.
- Ravaiano, S.V., de Paiva Ferreira R., de Oliveira Campos L.A. & Martins, G.F. (2014). The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. *Naturwissenschaften*. **101**, 603–611.
- Rebora, M., Piersanti, S., Almaas, T. J. & Gaino, E. (2007). Hygroreceptors in the larva of *Libellula depressa* (Odonata: Libellulidae). *Journal of insect physiology*. **53**, 550–558.
- Sakagami S.F. & Oniki Y. (1963) Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process: *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz. *Journal of the Faculty of Science Hokkaido University. Series VI. Zoology*. **15**, 300–318.
- Shanbhag, S.R., Müller, B. & Steinbrecht, R.A. (1999). Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*: 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **28**, 377–397.
- Schneider, D. (1964). Insect antennae. *Annual Review of Entomology*. **9**, 103–122.
- Snodgrass, R.E. (1956). *Anatomy of the Honey Bee*, Comstock Publishing Association. Ithaca, New York.

- Valuyskiy M.Y., Melnitsky S.I., & Ivanov V.D. (2017) Structure of antennal sensilla in the caddisfly genus *Rhyacophila pictet* (Trichoptera, Rhyacophilidae). *Entomological Review*. **97**, 703–722.
- Walther, J. R. (1983). Antennal patterns of sensilla of the Hymenoptera—a complex character of phylogenetic reconstruction. *Verh Naturwiss Ver Hambg*. **26**, 373–392.
- Wilson, E.O. (1971). *The insect societies*. Cambridge: Belknap Press Harvard University. P, 548.
- Yan, S.C., Meng, Z.J., Peng, L. & Liu, D. (2011). Antennal sensilla of the pine weevil *Pissodes nitidus* Roel. (Coleoptera: Curculionidae). *Microscopy research and technique*. **74**, 389–396.
- Zacharuk, R.Y. (1985). Antenna and sensilla. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. **6**, 1–69.

CONCLUSÕES GERAIS

- *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi* apresentam onze tipos de sensilas nos flagelômeros antenais.
- As análises morfométricas permitiram estabelecer diferenças entre as classes, castas e subcastas de *T. fiebrigi*, separando machos, rainhas e operárias dos soldados.
- A caracterização morfológica das sensilas permitiu determinar que os tipos e distribuição das sensilas entre as operárias de *T. angustula*, *T. fiebrigi* e *T. weyrauchi* são conservados para este gênero.
- Os estudos de morfometria das sensilas antenais do gênero *Tetragonisca* permitiu estabelecer que existem maiores diferenças destas em *T. weyrauchi* com a relação a *T. angustula* e *T. fiebrigi*
- De acordo com as análises morfométricas das sensilas antenais, *T. angustula* e *T. fiebrigi* formam um complexo de espécies, devido à separação incompleta encontrada, produto possivelmente de um processo de especiação recente.