Charles Fernando dos Santos

Biologia reprodutiva de rainhas e machos de *Tetragonisca*
angustula (Hymenoptera: Meliponini)

Reproductive biology of the queens and males of
Tetragonisca angustula (Hymenoptera: Meliponini)

São Paulo

2012

Charles Fernando dos Santos

Biologia reprodutiva de rainhas e machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini)

Reproductive biology of the queens and males of
Tetragonisca angustula (Hymenoptera: Meliponini)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Biológicas, na Área de Zoologia.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Vera Lucia Imperatriz-Fonseca

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Santos, Charles Fernando dos

Biologia reprodutiva de rainhas e machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).
181 páginas.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. Feromônios 2. Diversidade genética 3.
Morfometria I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Orientadora: Vera Lucia Imperatriz-Fonseca

Dedicatória

Dedico à minha mãe Ana Maria dos Santos,
minhas irmãs Andréia, Ana Cecília e Audrey,
meus sobrinhos, Caio e Sofia
e todos os meus familiares

Epígrafe

A coragem faz o homem

*Conhecimento popular de um povo cujas famílias vivem nas copas das
árvores a 40 metros do chão na savana africana*

Agradecimentos

Sou muito agradecido à Dra. VERA LUCIA IMPERATRIZ-FONSECA por ter me recebido e possibilitado que eu pudesse avançar academicamente. Aprendi muito com ela. Seus conselhos são pura inspiração e suas repreensões sábias para ouvidos atentos.

Sou grato à Dra. ANITA JOCELYNE MARSAIOLI, do Laboratório de Produtos Naturais e Labiosin para Microorganismos, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, pela coorientação e por disponibilizar seu laboratório para o estudo de ecologia química das abelhas sem ferrão.

Agradeço à recém Dra. FRANCISCA DIANA DA SILVA ARAÚJO pelo Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Sua colaboração e determinação foram essenciais para alcançarmos os resultados das análises químicas.

Agradeço à Dra. MARIA CRISTINA ARIAS, do Laboratório de Evolução e Genética de Abelhas - LGEA, Universidade de São Paulo, por ter me recebido em seu laboratório e disponibilizado todo material e recursos financeiros para que eu pudesse aprender e desenvolver análises moleculares de microssatélites.

Agradeço ao Dr. PAULO NOGUEIRA-NETO, Universidade de São Paulo, por ter disponibilizado a Fazenda Aretuzina em São Simão para eu instalar alguns ninhos-armadilha para captura de jataí.

Agradeço ao Dr. ADEMILSON ESPENCER EGEA SOARES, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo por ter cedido os dados de ninhos de *Tetragonisca angustula* dentro do *campus* desta instituição.

Agradeço o Dr. JOÃO MARIA FRANCO DE CAMARGO (*in memoriam*), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FFCLR-USP), por ter me ensinado a identificar machos de *Tetragonisca angustula* e *Tetragonisca fiebrigi*.

Agradeço à Dra. EDA FLÁVIA LOTUFO RODRIGUES ALVES PATRÍCIO por ter me auxiliado nas primeiras dissecções glandulares. Seus conselhos iniciais de alimentar rainhas de forma natural e de analisarmos também rainhas fisogástricas foram determinantes para esta pesquisa.

Agradeço ao Dr. TIAGO MAURÍCIO FRANCOY, da Escola de Ciências, Artes e Humanidades, Universidade de São Paulo, pela ajuda e conselhos durante as análises morfométricas.

Agradeço ao Dr. CRISTIANO MENEZES, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental, por ter me ajudado nas primeiras tentativas de criar rainhas de *T. angustula*.

Agradeço ao pesquisador *msc.* MAURO PRATO (FFCLR-USP) por ter criado e cedido rainhas virgens durante a fase inicial de meu projeto.

Agradeço à Dra. ASTRID DE MATOS PEIXOTO KLEINERT, à Dra. ISABEL ALVES-DOS-SANTOS e ao Dr. PÉRSIO DE SOUZA SANTOS FILHO, do Laboratório de Abelhas do Instituto de Biociências da

Universidade de São Paulo que foram minha banca de qualificação e contribuíram com excelentes sugestões para a continuidade e sucesso desse estudo.

Agradeço o Dr. ANTONIO MAURO SARAIVA, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo pela ajuda de custo através da Fundação de Apoio à Universidade de São Paulo.

Agradeço à Dra. MARILDA CORTOPASSI-LAURINO que me deu dicas importantes para analisar certos comportamentos dos machos de *T. angustula*.

Agradeço ao técnico PAULO CÉSAR FERNANDES, do Laboratório de Abelhas do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela ajuda durante algumas coletas, registros e alertas de enxameagens de várias espécies de abelhas sem ferrão.

Agradeço aos *nestmates* do Laboratório de Abelhas do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo que estão ou passaram por ali pela amizade e pelas dicas ao longo desses anos e, recentemente, durante nossos seminários internos, nos nomes de: Dr. SERGIO DIAS HILÁRIO, Dra. DENISE DE ARAÚJO ALVES, MARIANA IMPERATRIZ-FONSECA, *msc.* ANDRE LUIS ACOSTA, *msc.* CARLOS EDUARDO PINTO, Dra. CRISTINA GIANNINI, *msc.* GUARACI DURAN CORDEIRO, Dr. SAMUEL BOFF, SHEINA KOFFLER, CLAUDIA SAITO, Dra, FABIANA CURTOPASSI PIOKER-HARA, *msc.* MARIANA TANIGUCHI, Dra. PAOLA MARCHI, MARIA DA GLÓRIA (BÁ).

Agradeço aos companheiros do LGEA pela ajuda durante os procedimentos e análises moleculares, nos nomes de: SUZY COELHO OLIVEIRA, *msc.* FLAVIO DE OLIVEIRA FRANCISCO, *msc.* ELAINE APARECIDA FRANÇOSO, LEANDRO RODRIGUES SANTIAGO.

Agradeço aos amigos da FFCLR-USP pela amizade e auxílio durante minhas visitas à Ribeirão Preto: Dr. SIDNEI MATEUS, Dra. CLAUDIA INÊS DA SILVA, *msc.* AYTON VOLLET NETO, *msc.* MARIA JULIANA FERREIRA- CALIMAN, KÁTIA PAULA ALEIXO, *msc.* JUAN M. ROSSO-LODOÑO.

Agradeço aos grandes amigos do curso de Biologia da Universidade Estadual Paulista, *campus* Bauru, pela amizade ao longo desses anos: SERGIO COSTA AGUIAR, *msc.* THIAGO VERNASCHI VIEIRA DA COSTA, DANIELE VICTORATTI, NELSON PAULI NETO, *msc.* CESAR OSCAR ORNELAS, Dr. HELBERT MEDEIROS E *msc.* VÂNIA MEDEIROS.

Sou grato ao programa de Pós Graduação em Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de me titular academicamente.

Sou grato à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutoramento e pela ajuda de custo em viagens de campo pelo programa PROAP e posteriormente PROEX.

Agradeço a DEUS, sobretudo, por ter mandado ventos fortes para que esta oliveira aprofundasse ainda mais suas raízes.

Índice

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Biologia reprodutiva e sistemas de acasalamento em abelhas.....	1
Agregações de machos em abelhas sem ferrão.....	3
Acasalamento em abelhas sem ferrão.....	6
Sistema de determinação sexual.....	6
Abordagem multidisciplinar da reprodução nos Meliponini.....	7
Tetragonisca angustula.....	8
OBJETIVOS DA TESE.....	10
QUESTÕES NORTEADORAS.....	10
Criação in vitro de rainhas virgens de Tetragonisca angustula.....	12
Localização de ninhos naturais, racionais e em processo de fundação.....	20
CAPÍTULO 1.....	25
Secreções glandulares abdominais e fontes de feromônios em rainhas de Tetragonisca angustula (Apoidea: Meliponini).....	25
Abstract.....	25
Resumo.....	26
1. Introdução	27
2. Materiais e Métodos.....	29
2.1. Procedimentos experimentais gerais.....	29
2.2. Análises de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas	30
2.3. Análises ¹ H-, ¹³ C-NMR e DEPT	30
2.4. Insetos	31
2.5. Bioensaios de atração química a rainhas virgens e fisogástricas.....	31
2.6. Obtenção dos compostos voláteis.....	32
2.7. Quantificação de hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila dos voláteis das rainhas virgens e fisogástricas	33
2.8. Extratos abdominais e cuticulares.....	34
2.9. Extração das glândulas de Dufour e tergaes.....	35
2.10. Índice de retenção.....	35
2.11. Derivatizações DMDS/I2 e síntese de compostos voláteis.....	36
3. Resultados.....	36
3.1. Quantidade de machos atraídos.....	36
3.2. Respostas dos machos aos odores de rainhas virgens e fisogástricas	37
3.2. Compostos adsorvidos por aeração.....	39
3.3. Extratos das ceras cuticulares.....	39

3.4. Extratos abdominais.....	41
3.5. Composição das glândulas de Dufour das rainhas virgens e fisogástricas	41
3.6. Composição das glândulas tergaís das rainhas virgens e fisogástricas	41
4. Discussão.....	44
4.1. Compostos liberados ativamente pelas rainhas e fonte glandular.....	44
4.2. Glândulas abdominais participam juntas na liberação de voláteis atrativos para os machos?.....	45
4.3. Compostos não-voláteis das rainhas poderiam estimular o comportamento sexual dos machos?.....	46
4.4. Significado biológico potencial do hexanoato de isopropila (HI)	47
4.5. Octadecenoato de octadecila em glândulas de Dufour de rainhas virgens.....	49
CAPÍTULO 2.....	54
Extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas de <i>Tetragonisca angustula</i> (Meliponini): perfil químico e bioensaio.....	54
Abstract.....	54
Resumo.....	55
1. Introdução.....	56
2. Materiais e Métodos.....	59
2.1. Insetos.....	59
2.2. Extratos cefálicos das rainhas de <i>Tetragonisca angustula</i>	60
2.3. Bioensaios.....	60
3. Resultados.....	61
3.1. Perfil químico dos extratos cefálicos.....	61
3.2. Teste de campo com os extratos cefálicos.....	62
4. Discussão.....	64
4.1. Composição química dos extratos cefálicos das rainhas.....	64
4.2. Nerol nos extratos cefálicos de rainhas virgens de <i>Tetragonisca angustula</i>	65
4.3. Bioensaios com extratos cefálicos.....	66
CAPÍTULO 3.....	69
Perfil químico de machos de <i>Tetragonisca angustula</i> (Meliponini) dentro e fora dos ninhos e alguns comportamentos intranidais.....	69
Abstract.....	69
Resumo.....	70
1. Introdução.....	71
2. Materiais e Métodos.....	74
2.1. Obtenção dos machos dentro dos ninhos.....	74
2.2. Obtenção dos machos fora dos ninhos (agregações reprodutivas).....	75
2.3. Extratos de cefálicos e abdominais e análise no CG/MS.....	75

2.2. Análise dos dados.....	75
3. Resultados.....	76
3.1. Quantidade de machos emergidos em colônias órfãs e alguns comportamentos típicos nas arenas.....	76
3.2. Composição química dos extratos cefálicos dos machos.....	78
3.3. Análise química do abdome e da cutícula de machos em agregações reprodutivas.....	80
4. Discussão.....	81
4.1. Comportamento dos machos antes de abandonar os ninhos.....	81
4.1.1. Desidratação de néctar.....	81
4.1.2. Agressão dos machos por operárias dentro dos ninhos.....	83
4.1.3. Abandono dos ninhos pelos machos.....	84
4.2. Compostos químicos dos machos.....	84
CAPÍTULO 4.....	89
Diversidade e estruturação genética de machos de <i>Tetragonisca angustula</i> em fundações de ninho e potencial de dispersão.....	89
Abstract.....	89
Resumo.....	90
1.1. Determinação sexual em abelhas.....	91
1.2. Processo de fundação do ninho e acasalamento.....	91
1.3. Marcadores moleculares de locus microssatélites para estimar aspectos biológicos em abelhas	93
1.4. Outros usos dos marcadores moleculares na ecologia comportamental da abelhas	93
2. Materiais e Métodos.....	95
2.1. Fundações em ninho-armadilha e coleta de indivíduos.....	95
2.2. Locais dos ninhos e distâncias entre eles.....	96
2.3. Coleta de operárias de ninhos racionais e naturais coletados.....	97
2.5. Primers e amplificação dos microssatélites por PCR.....	98
2.6. Análise dos dados.....	101
2.6.2. Colônias de origem e reconstrução do genótipo materno.....	102
2.6.5. Distância de dispersão dos machos de suas colônias de origem até as agregações.....	106
3. Resultados.....	106
3.1. Parâmetros de diversidade genética.....	106
3.2. Distância genética de Nei.....	113
3.3. Diferenciação genética – estimativa ϕ_{PT}	114
3.4. Colônias contribuindo com machos.....	115

3.5. Genótipos das rainhas e parentesco com os machos.....	118
3.6. Estruturação genética das agregações.....	120
3.7. Dispersão dos machos.....	121
4. Discussão.....	122
4.1. Diversidade genética entre as agregações.....	122
4.2. Machos provenientes das mesmas colônias nas agregações.....	123
4.3. Quantidade de colônias contribuindo com machos.....	124
4.4. Estruturação genética das agregações.....	125
4.5. Parentesco entre machos e rainhas.....	127
4.6. Dispersão dos machos de seus ninhos de origem até as agregações reprodutivas.....	128
CAPÍTULO 5.....	130
Análise morfométrica de machos de tetragonisca angustula (meliponini) em agregações reprodutivas.....	130
Abstract.....	130
Resumo.....	131
1. Introdução.....	132
2. Materiais e Métodos.....	134
2.1. Locais das amostras.....	134
2.2. Análises Morfométricas.....	135
2.3. Análises estatísticas.....	136
3. Resultados.....	136
4. Discussão.....	140
4.1. Populações de machos de Tetragosnica angustula diferenciados pela morfometria.....	140
4.2. Potenciais estudos com machos de abelhas sem ferrão utilizando morfometria geométrica.....	142
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	144
RESUMO GERAL.....	149
ABSTRACT.....	150
Referências Bibliográficas.....	151
ANEXOS E APÊNDICES.....	163
Headspace Dinâmico.....	163
Enxameagens em ninhos-armadilha.....	163
Quantidade de ninhos naturais e colmeias que tiveram operárias genotipas e identificação de suas colônias.....	165
Genótipo dos machos	166
Genótipos das operárias.....	173

<u>Genótipo das rainhas.....</u>	<u>175</u>
<u>Significância de parentesco entre machos e rainhas</u>	<u>177</u>
<u> Coordenadas geográficas das colônias naturais, colmeias e ninhos-armadilha</u>	<u>177</u>
<u>Rotas dos machos de suas colônias de origem identificadas até as agregações.....</u>	<u>181</u>

INTRODUÇÃO GERAL

Biologia reprodutiva e sistemas de acasalamento em abelhas

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera, superfamília Apoidea e possuem cerca de 20.000 espécies distribuídas em, praticamente, todas as regiões do planeta (MICHENER, 2007). Esses insetos apresentam vários tipos de associações entre seus indivíduos exibindo desde o estilo de vida solitário ao verdadeiramente social (MICHENER, 1974). A dependência de produtos florais para a alimentação da prole evidencia uma estreita relação com as flores que resulta no importante papel das abelhas como um dos principais agentes polinizadores na natureza (MICHENER, 2007). Nos grupos verdadeiramente sociais há sobreposição de geração entre os indivíduos, cuidado cooperativo da cria e divisão reprodutiva de trabalho (MICHENER, 1974). As são as rainhas e operárias, e os machos e as rainhas representam os sexuais (MICHENER, 1974).

Devido à grande riqueza de espécies e hábitos de vida, as abelhas apresentam uma ampla gama de comportamentos reprodutivos sendo que os machos exibem uma variedade maior nas estratégias e nos comportamentos reprodutivos. (ALCOCK *ET AL.*, 1978; EICKWORT & GINSBERG, 1980). A maior diversidade de comportamentos reprodutivos é encontrada em espécies solitárias onde os machos, muitas vezes, possuem sítios de encontros (*rendezvous sites*), geralmente estabelecidos na vegetação (*e.g.* flores) ou nas proximidades de ninhos onde procuram por fêmeas reprodutivas (ALCOCK *ET AL.*, 1977A; 1978; EICKWORT & GINSBERG, 1980; PAXTON 2005; SUGIURA 2008). Esses locais costumam ser patrulhados ou demarcados como territórios pelos machos demonstrando, assim, que a busca por parceiras sexuais não ocorre de modo aleatório no ambiente (VELTHUIS & CAMARGO, 1975; ALCOCK *ET AL.* , 1977A; EICKWORT, 1977;

KIMSEY, 1980; VELTHUIS & GERLING, 1980; BARROWS, 1983; SHIMRON & HEFETZ, 1985; BAER, 2003).

Embora cada espécie apresente uma estratégia reprodutiva típica, é comum que diferenças de tamanho entre os indivíduos, por exemplo, influencie na tomada de uma estratégia reprodutiva alternativa. Assim, pode haver aqueles territorialistas, geralmente maiores e dominantes, que têm acesso aos ninhos com as fêmeas e que expulsam os menores, intrusos, que passam então a patrulhar marginalmente flores e arbustos (ALCOCK *ET AL.*, 1977A; LEYS & HOGENDOORN, 2008; OLIVEIRA & SCHLINDWEIN, 2010).

As oportunidades de estratégias reprodutivas alternativas em machos de abelhas não se encerram nas diferenças de tamanho, entretanto. Elas podem mudar, ainda, dependendo da disponibilidade de recursos alimentares, locais de nidificação, quantidade de parceiros sexuais e competidores, ou mesmo, por fatores sazonais (ALCOCK *ET AL.*, 1977B; 1978; VELTHUIS & GERLING, 1980; MEDEIROS & SCHLINDWEIN, 2003; SUGIURA, 2008; ALCOCK *ET AL.*, 2010; OLIVEIRA & SCHLINDWEIN, 2010). Entretanto, a emissão de pistas químicas ou a sinalização por feromônios sexuais emitida por um dos parceiros parece unir a maioria dessas estratégias reprodutivas otimizando, assim, as chances de encontro entre os pares (PAIN & RUTTNER, 1963; BUTLER & FAIREY, 1964; VELTHUIS & CAMARGO, 1975; ALCOCK *ET AL.*, 1977A; VELTHUIS & GERLING, 1980; DRESSLER, 1982; AYASSE *ET AL.*, 2001; ELTZ *ET AL.*, 2005)

Os tipos de estratégias reprodutivas apresentados pelas espécies de abelhas solitárias surpreendem pela ampla diversidade, mas aquelas estratégias adotadas por machos de espécies sociais também chamam muito a atenção. Os machos das abelhas corbiculadas altamente sociais (Apidae: Apini, Meliponini e Bombini) tendem a não apresentar estratégias reprodutivas alternativas, vindo a se agregarem, geralmente, em grande quantidade em ambientes aéreos, substratos ou nas proximidades de ninhos

(Tabela 1). Nessas numerosas reuniões de indivíduos, os machos das abelhas sociais parecem estar sob forte pressão seletiva por terem que exibir grande vigor físico, capacidade de vôo, orientação e desempenho sem, no entanto, apresentarem qualquer competição agressiva entre eles (ROUBIK, 1990; JAFFÉ & MORITZ, 2010).

Quando se analisa especificamente os comportamentos dos machos de espécies de abelhas verdadeiramente eussociais observa-se que suas estratégias são bastante fixas podendo ser: (1) agregações aéreas em áreas de congregação de zangões (Apini) que ocorrem periodicamente e sistematicamente em uma determinada localidade (PUNCHIHEWA *ET AL.*, 1990; KOENIGER *ET AL.*, 1994; KOENIGER *ET AL.*, 2005; JAFFÉ *ET AL.*, 2009); (2) agregações de machos em substratos aleatórios do ambiente denominados sítios de congregação (Meliponini) (SOMMEIJER & BRUIJN, 1995; SOMMEIJER *ET AL.*, 2003); (3) agregações de machos nas proximidades de ninhos coespecíficos com rainhas virgens ou em ninhos em processo de fundação (Meliponini) (NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR *ET AL.*, 1962; BROWN, 1997; IMPERATRIZ-FONSECA *ET AL.*, 1998; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000B).

Tabela 1. Estratégias reprodutivas de machos de abelhas eussociais (Hymenoptera: Apidae: Apini, Meliponini, Bombini).

Tribos	Agregações perto de ninhos	Poleiros	<i>Hilltopping</i>	Marcação com odor	Sítio de congregação	Área de congregação
Apini ¹	-	-	-	-	-	X
Meliponini ¹	X	-	-	-	X	-
Bombini ²	X	X	X	X	-	-

1 – verdadeiramente eussociais.

2 – primitivamente eussociais.

Agregações de machos em abelhas sem ferrão

As agregações de machos de abelhas sem ferrão nas proximidades dos ninhos (Figura 1) é um fenômeno difícil de prever sua ocorrência e observar, pois eles estão diretamente relacionados à presença de rainhas virgens dentro das colônias ou de ninhos sendo fundados por operárias (MICHENER, 1946; NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR *ET AL.*, 1962; IMPERATRIZ-FONSECA *ET AL.*, 1998; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000A; SOMMEIJER *ET AL.*, 2003). Acredita-se que o principal fator responsável pela formação das agregações de machos nas proximidades de ninhos coespecíficos seja a liberação de feromônios sexuais pelas fêmeas reprodutivas e receptivas, ou seja, as rainhas virgens (ENGELS & ENGELS, 1984; ENGELS, 1987; ENGELS *ET AL.*, 1997; ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000A; SOMMEIJER *ET AL.*, 2003).

Porém, esse tema ainda está em aberto e há outras hipóteses para explicar a atração de machos para perto dos ninhos. Uma delas é a possível liberação de odores pelas rainhas fisogástricas ou por operárias fundadoras de novos ninhos que poderiam ter algum papel na atração dos machos (CORTOPASSI-LAURINO, 1979). Outra explicação é que operárias que mantêm íntimo contato com as rainhas virgens possam ter alguma participação indireta em atrair os machos, formariam trilhas de odor no ambiente que seriam seguidas pelos machos (ROUBIK, 1990; ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990).

Os machos também teriam alguma participação quando aqueles que encontram ninhos de interesse liberassem ali compostos químicos que seriam identificados e seguidos por outros machos e, assim sucessivamente, formando as grandes agregações reprodutivas (LÓPEZ & KRAUS, 2009). No gênero *Melipona* há fortes indícios de que os machos sejam os responsáveis pela atração de rainhas virgens até os sítios de congregação (SOMMEIJER & BRUIJN 1995; SOMMEIJER *ET AL.* 2003).

Figura 1. Agregações reprodutivas de machos de abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Meliponini) nas proximidades de ninhos coespecíficos. A – *Plebeia pugnax*; B – *Scaptotrigona depilis*; C – *Tetragonisca angustula*; D – *Trigona spinipes*.

A despeito de quem atrai quem, o fato é que essas agregações reprodutivas de machos de abelhas sem ferrão são compostas por numerosos indivíduos provenientes de diversas colônias (PAXTON, 2000; CAMERON *ET AL.*, 2004; MUELLER *ET AL.*, 2012). Essas agregações tendem a aumentar gradativamente ao longo dos dias (NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998), podendo durar vários dias ou semanas (NOGUEIRA-NETO, 1954; ENGELS & ENGELS, 1984; LÓPEZ & KRAUS, 2009), mas diminuem gradualmente quando a rainha se acasala (Kerr *et al.*, 1962; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000A). Durante esses eventos reprodutivos os machos estão sujeitos a vários tipos de predação (KOEDAM *ET AL.*, 2009; 2011), parasitismo (BROWN, 1997) e, até mesmo, a receberem visitas de machos de outras espécies de abelhas sem ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR *ET AL.*, 1962).

Acasalamento em abelhas sem ferrão

No sistema de acasalamento apresentado pelos machos de abelhas sem ferrão, onde os indivíduos se agregam nas proximidades de ninhos coespecíficos, a reprodução ocorre após a rainha virgem, sexualmente atrativa e receptiva, abandonar temporariamente o ninho e realizar o vôo nupcial na presença de vários machos (KERR *ET AL.*, 1962; ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA 1990; IMPERATRIZ-FONSECA *ET AL.*, 1998). Via de regra, a rainha virgem se acasala uma única vez e com um único macho (KERR & KRAUSE, 1950; KERR *ET AL.*, 1962; PETERS *ET AL.*, 1999).

Os machos das abelhas sem ferrão são obrigatoriamente monogâmicos porque o indivíduo bem sucedido na cópula com a rainha deixa em seu trato reprodutivo um sinal de acasalamento que funciona como um *plug* (KERR & KRAUSE, 1950). Este *plug* é uma parte quitinizada da genitália evertida do macho que conseqüentemente morre pouco após a cópula ou eversão de sua genitália (KERR & KRAUSE, 1950).

Sistema de determinação sexual

O sistema de determinação sexual em insetos Hymenoptera (abelhas, formigas e vespas) é haplodiplóide significando que os ovos fertilizados heterozigotos darão origem a fêmeas diplóides (operárias e rainhas) e os ovos não fecundados (hemizigotos) darão origem a machos haplóides (COOK & CROZIER, 1995; HEIMPEL & BOER, 2008). Devido a esse sistema haplodiplóide, as operárias também podem produzir machos por colocarem ovos não fecundados (reprodutivos) (BEIG, 1972; BEGO, 1982; KOEDAM *ET AL.*, 1999) podendo, então, competir com as rainhas fisogástricas em relação à postura de machos (TÓTH *ET AL.*, 2002; VELTHUIS *ET AL.*, 2005).

A haplodiploidia possui ainda outras peculiaridades sendo que uma das mais desastrosas é a possibilidade de emergirem dentro das colônias machos diplóides

provenientes do acasalamento endogâmico de suas rainhas (CAMARGO, 1979; PAXTON, 2005). Quando os indivíduos diplóides são homozigotos para o locus único de determinação sexual complementar (*sl-csd*, sigla em inglês), ao invés de emergirem fêmeas, nascem machos diplóides (COOK & CROZIER, 1995; HEIMPEL & BOER, 2008).

Caso ocorra o aparecimento desses machos dentro dos ninhos pode haver uma redução considerável na produção de operárias devido à emergência indivíduos (machos diplóides) que são usualmente estéreis (CAMARGO, 1979). Com isso, os ninhos não ganham nem em sobrevivência (cuidado com a cria e manutenção dos ninhos) nem em reprodução.

Abordagem multidisciplinar da reprodução nos Meliponini

Uma abordagem multidisciplinar no estudo de abelhas sem ferrão pode trazer informações valiosas sobre a biodiversidade local ou regional por adicionar, por exemplo, análises moleculares, químicas e morfométricas em um único trabalho (FRANCISCO *ET AL.*, 2008). Quando o assunto é *machos de abelhas sem ferrão* o uso de diversas ferramentas moleculares, químicas e morfométricas para analisar seus indivíduos ou agrupamentos pode ser muito informativo ao esclarecer questões importantes sobre a biologia reprodutiva desses indivíduos. Apesar disso, pesquisas relacionadas aos machos das abelhas ainda são poucas quando comparadas àquelas feitas com as fêmeas (KOENIGER, 2005).

Em abelhas sem ferrão, por exemplo, os primeiros estudos com os machos tratavam especificamente de seus comportamentos em agregações provendo dados fundamentais até os dias de hoje sobre a biologia reprodutiva desses indivíduos (MICHENER, 1946; NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR *ET AL.*, 1962). Porém, com o uso de técnicas recentes de análises (FRANCISCO *ET AL.*, 2008) é possível obter ainda mais

informações biológicas sobre os machos das abelhas. Desse modo, questões relacionadas aos padrões químicos que caracterizam as cutículas ou as glândulas dos indivíduos, a variedade molecular e os relacionamentos genéticos entre pares de indivíduos, assim como, padrões morfométricos que modelam diferentes grupos de indivíduos podem ter importantes implicações nos estudos sobre a conservação e a diversidade das abelhas tropicais.

Tetragonisca angustula

A biodiversidade brasileira de abelhas é muita grande e o caso das abelhas sem ferrão ilustra bem esse cenário. Essas abelhas possuem distribuição pantropical e exibem uma grande diversidade de espécies na região neotropical (CAMARGO & PEDRO, 1992). Na região Neotropical, a riqueza de espécies é elevada possuindo cerca de 400 espécies registradas sendo que, destas, apenas algumas são estudadas e conhecidas profundamente (CAMARGO & PEDRO, 2008).

Uma das representantes mais conhecidas são as abelhas do gênero *Tetragonisca* cujas operárias e os machos são de tamanho muito pequeno (4-5 mm), delgados e de cor predominantemente preto e amarelo/ laranja – Figura 2.

Formalmente há no território brasileiro 3 espécies do gênero *Tetragonisca*: *T. angustula*, *T. weyrauchi* e *T. fiebrigi* (CAMARGO & PEDRO, 2008). Porém, (CAMARGO, 2009 - comunicação pessoal) considerava haver pouco mais de 20 espécies por descrever. A espécie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), descrita originalmente por Illiger em 1806, apresenta uma distribuição Neotropical alcançando do México ao sul do Brasil (CAMARGO & PEDRO, 2008) – Figura 3.

Figura 2. *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini): A – tubo de entrada vigiado por várias guardas e uma campeira iniciando sua viagem de forrageio; B – macho em postura típica com a antena em forma de V e corto elevado em relação ao substrato. A figura A foi cedida por Paulo César Fernandes. Laboratório de Abelhas da Universidade de São Paulo.

Essa espécie é muito comum em vários estados brasileiros (SILVEIRA *ET AL.*, 2002), sendo uma das abelhas sem ferrão melhor estudada pela quantidade de trabalhos realizados com elas (CAMARGO & PEDRO, 2008). Ela é uma espécie de abelha sem ferrão mais criada por meliponicultores e populares, sendo conhecida pela população pelo nome de jataí. Seus ninhos são comuns em áreas naturais e urbanas.

Figura 3. Distribuição Neotropical de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). CAMARGO & PEDRO (2008). mapCria. Fonte: Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA).

OBJETIVOS DA TESE

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral analisar o perfil químico de machos e rainhas da espécie *Tetragonisca angustula* (LATREILLE, 1811). Juntamente com as análises químicas, o trabalho buscou analisar genética e morfometricamente machos que se agregavam próximos de ninhos em processo de fundação. Os principais enfoques foram, então, conhecer quais compostos químicos eram liberados ou estavam presentes em glândulas de rainhas virgens e fisogástricas que pudessem agir como feromônios sexuais (**capítulos 1 e 2**); comparar o perfil químico de machos coletados dentro dos ninhos com aqueles presentes em agregações reprodutivas (**capítulo 3**); analisar a diversidade genética das agregações, assim como, quantas colônias contribuem com machos nessas agregações e avaliar o parentesco entre os machos e as rainhas aparentadas às operárias fundadoras (**capítulo 4**); avaliar o potencial de dispersão dos machos de seus ninhos de origem até as agregações (**capítulo 4**); Analisar a estruturação morfométrica dos indivíduos compondo agregações de diferentes localidades (**capítulo 5**).

QUESTÕES NORTEADORAS

Alcançar os objetivos do presente estudo exigiu paciência e persistência por dois motivos principais: (1) a pequena disponibilidade de rainhas para análises e (2) a ocorrência imprevisível de agregações de machos. No primeiro caso, as rainhas virgens dentro de colônias ativas são raras e é preciso muitas colônias para se obter algumas delas. A porcentagem de rainhas virgens em *T. angustula* pode não passar de 1-2% em um determinado período ou mesmo não ser registrada a presença de nenhuma realeira dentro do ninho (VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000B; PRATO 2010). Por outro lado, no caso das rainhas fisogástricas, a remoção delas de dentro dos ninhos destrutura

completamente as colônias, principalmente quando não há rainhas substitutas (virgens) para repor as rainhas-mães. Inclusive, muitas colônias foram perdidas inicialmente para se analisar quimicamente as rainhas fisogástricas. Porém, a disponibilidade de rainhas virgens para as análises era um impeditivo maior ao prosseguimento da pesquisa porque elas eram muito mais difíceis de obter naturalmente e na fase sexualmente atrativa adequada para as nossas análises.

Assim, uma forma de contornarmos essa limitação foi criar artificialmente rainhas virgens por uma técnica que estava sendo recentemente padronizada por dois pesquisadores da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), na Universidade de São Paulo, Dr. CRISTIANO MENEZES e *Msc.* MAURO PRATO. O primeiro, sendo orientado pela Dr^a. VERA LÚCIA IMPERATRIZ-FONSECA, embora estivesse focado na criação *in vitro* de rainhas de *Scaptotrigona depilis*, estendeu a técnica para *Tetragonisca angustula* com algumas modificações e me auxiliou a fazer as primeiras tentativas. Por sua vez, MAURO PRATO, cujo tema da pesquisa era especificamente a criação *in vitro* de rainhas de *T. angustula*, também foi fundamental ao criar e nos ceder em algumas oportunidades rainhas virgens para análises químicas.

Porém, devido à minha inexperiência inicial, muitas das análises das primeiras rainhas virgens criadas tiveram que ser refeitas. Na época a Dr^a. EDA FLÁVIA PATRÍCIO me auxiliava a dissecar e identificar as glândulas abdominais. Sabendo ela que eu estava alimentando as jovens rainhas inadequadamente com xarope composto de água com açúcar e sem pólen, me recomendou fortemente a descartar todas as análises feitas até aquele momento. Nesse período, entretanto, tanto o CRISTIANO MENEZES quanto MAURO PRATO não podiam mais me auxiliar e eu resolvi, então, desenvolver a técnica de criação *in vitro* de rainhas virgens no Laboratório de Abelhas da Universidade de São Paulo, em São Paulo. Embora as primeiras tentativas tenham sido desastrosas devido à baixa taxa

de emergência e sobrevivência (5%), pudemos aprimorar a técnica e obter um sucesso no final de cerca de 65%. Somado a isso, pudemos desenvolver uma técnica para tornar as rainhas virgens atrativas sexualmente, o que não tinha ocorrido até então.

O segundo obstáculo às nossas análises seria prever a ocorrência natural de agregações de machos nas proximidades de ninhos, pois as agregações de machos somente ocorrem se houver rainhas virgens dentro dos ninhos. A idéia inicial era dividir artificialmente ninhos ativos em colônias-filhas (com células reais) e -mães (com rainhas fisogástricas). Porém, em todos os pilotos não houve a presença de machos nas proximidades dos ninhos. A solução encontrada foi a utilização de ninhos-armadilha dentro dos *campi* da USP em Ribeirão Preto e São Paulo. Resultados promissores realizados no *campus* da USP em Ribeirão Preto indicavam que a técnica de ninho-armadilha era bem sucedida na obtenção de enxames de algumas espécies de abelhas sem ferrão, dentre elas, *T. angustula* (OLIVEIRA ET AL., 2009; OLIVEIRA ET AL., 2012) .

Devido a criação *in vitro* de rainhas e a instalação de ninhos-armadilha terem sido fundamentais para obtermos praticamente todos os resultados da presente tese, eu descrevo abaixo sucintamente essas técnicas, antes de iniciar os capítulos mencionados anteriormente.

Criação *in vitro* de rainhas virgens de *Tetragonisca angustula*

A quantidade de alimento oferecido às larvas femininas em abelhas sem ferrão é um fator determinante de castas (operárias e rainhas), portanto, pode-se induzir a produção de rainhas virgens manipulando a quantidade de alimento larval (CAMARGO, 1972A,C). Com esse foco em mente, o presente protocolo que se segue é baseado nas recentes técnicas desenvolvidas extensamente por MENEZES (2010) e PRATO (2010) com

algumas modificações em relação aos tipos de solutos e na temperatura de incubação das larvas.

Primeiramente, foram escolhidos os favos de cria recém construídos para fornecerem o alimento larval e os favos de cria um pouco mais velhos para ceder as larvas. Essas larvas eram preferencialmente de 1-3 dias de idade, mas eventualmente larvas mais velhas também eram utilizadas. Após a seleção dos respectivos favos, eram feitas a transferência de 50µL de alimento larval com pipeta manual graduada para cada um dos 96 poços de uma placa de Elisa (7 mm Ø x 10 mm de profundidade). Eventualmente, outras placas de acrílico foram utilizadas. Posteriormente, as larvas eram transferidas para os poços com auxílio de um estilete modificado na ponta, tomando-se cuidado para colocar as larvas sobre o alimento, evitando afogá-las.

Feitas as transferências do alimento e das larvas, a placa era acondicionada dentro de um recipiente plástico que continha um filme de água mineral (Figura 4), a fim de manter a umidade relativa a cerca de 100% pelos primeiros 3 dias e, em seguida, incubadas a 30° C em câmara de germinação 347-CDG FANEM®. Cabe destacar que inicialmente as larvas estavam sendo criadas a 28° C, como proposto por MENEZES (2010) e PRATO (2010). Entretanto, após assistir a uma apresentação sobre a biologia térmica em colônias de *S. depilis* (VOLLET-NETO, 2011), onde o autor verificou que criação natural de pupas daquela espécie a 30° C tinha elevada taxa de sucesso, eu resolvi incubar as minhas rainhas a 30° C. Visivelmente essa modificação experimental elevou a taxa de larvas de *T. angustula* chegando ao estágio adulto e emergindo.

Decorridos os três dias iniciais, fungos começam a aparecer dentro dos poços e, ao contrário dos resultados com larvas de *S. depilis* (MENEZES 2010), eles não são consumidos e podem contaminar e matar as larvas. Assim, a umidade relativa deve ser reduzida para menos que 100% o suficiente para diminuir as chances de proliferação

dos fungos, mas mantendo ainda o alimento úmido e não ressecado para consumo pelas larvas. Desse modo, a água antiga deve ser substituída por nova acrescentando, agora, cloreto de potássio (KCl) (MENEZES 2010, comunicação pessoal) ou açúcar comercial (sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$))¹ até saturar a solução. A umidade relativa nessa fase fica em torno de 80-90% (Tabela 2; Figura 5).

Figura 4. Criação *in vitro* de rainhas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Larvas acondicionadas em recipientes plásticos com uma película de água.

¹ A adição de açúcar foi um imprevisto que se mostrou eficiente para substituir o KCl, porém, mais testes devem ser feitos para averiguar seu potencial de controlar a umidade durante o processo de incubação.

Figura 5. Criação *in vitro* de rainhas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Larvas com 11-12 dias de idade.

Após cerca de 12-14 dias as larvas já consumiram praticamente todo o alimento larval. Deve-se, então, renovar novamente a água, adicionando agora açúcar comercial e sal comum (NaCl) até saturar a solução e retornar à incubadora a 30° C. Essa etapa, quando as larvas iniciam o processo de pupação, é mais longa e a umidade deve ficar em torno de 70-80% (Figura 6). Restando 2-3 dias antes dos imagos emergirem, ou seja, entre o 41° ao 42° dia de criação, deve-se remover toda a solução salina de dentro do recipiente porque, assim que os imagos começam a emergir, aos 44-45 dias, eles podem se afogar na solução (Figura 7). Entretanto, é recomendável colocar um chumaço úmido de algodão a fim de manter certa umidade dentro do recipiente. O tempo de emergência das rainhas está de acordo com o período de desenvolvimento de rainhas naturais e criadas *in vitro* (PRATO, 2010). Nenhuma das etapas foi registrada a emergência de machos gigantes. Os detalhes do controle da umidade relativa se encontram na Tabela 2 e Figura 8.

Figura 6. Criação *in vitro* de rainhas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Pupas.

Figura 7. Criação *in vitro* de rainhas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Rainhas virgens recém-emergidas. Algumas delas (à direita) se afogaram na umidade que condensou dentro do recipiente. Outras (à esquerda) repousam sobre o algodão umedecido.

Após a emergência, as jovens rainhas devem ser colocadas aos pares em um recipiente, no caso foram placas de Petri, com 20-30 operárias jovens, favos de cria prestes a emergir, mel e pólen *ad libitum* da própria espécie. Duas constatações, embora não analisadas profundamente, surgiram ao monitorar o comportamento das rainhas com as operárias e com outras rainhas. Primeiramente, eu observava que operárias mais velhas, que inclusive ficavam tentando alçar vôo dentro das placas de Petri, agrediam constantemente as rainhas mordendo suas antenas, pernas ou outras partes corporais. Essas operárias pigmentadas que agrediam as rainhas eram prontamente removidas das placas, pois algumas vezes eu perdi rainhas que foram mortas por elas.

Tabela 2. Criação *in vitro* de rainhas virgens de *Tetragonisca angustula* (Meliponini). Sobrevivência a diferentes solutos e temperatura.

Fases	KCL		C ₆ H ₁₂ O ₆	
	28º C		28º C	30º C
larvas	100%	100%	100%	100%
larvas	40.60%	84.30%	96.80%	88.50%
pupas	19.70%	54.10%	45.80%	80.20%
imagos	11.40%	21.80%	37.60%	68.70%

Figura 8. Criação *in vitro* de rainhas virgens de *Tetragonisca angustula* (Meliponini). Temperatura 31.15° C (± 0.33); umidade relativa 82.64% (± 9.25). DataLogger HOBO BoxCar Pro 4. LinePlot, Statistica 7.

A outra constatação que foi muito importante para as análises químicas posteriores foi que as rainhas que eram mantidas com pelo menos outra jovem rainha tendiam a tornarem-se sexualmente atrativas. Ou seja, quando as rainhas eram mantidas somente com as operárias, embora houvesse interação entre elas (trofaláxis), as jovens rainhas não assumiam um comportamento típico de rainha como aqueles descritos por IMPERATRIZ-FONSECA E ZUCCHI (1995) e NOGUEIRA-FERREIRA E COL. (2009). Elas permaneciam muito tempo imóveis sobre os favos de cria e nas análises químicas iniciais nós praticamente não encontrávamos compostos voláteis nas mesmas. Porém, quando duas rainhas foram mantidas juntas, por algum motivo, isso estimulou fisiologicamente as rainhas e sempre uma delas assumia um papel mais dominante em relação à outra. Categoricamente, uma delas comportava-se como fêmea-alfa, subjugando a outra com mordidas e empurrões, movimentando-se agitadamente dentro da placa de Petri, vibrando as asas constantemente e solicitando trofaláxis às operárias de maneira brusca.

Eu pude perceber então que, mantendo uma possível competidora com a outra, alterava o contexto social das jovens rainhas estimulando, ao menos, uma delas a agir como potencial rainha da “mini-colônia”. Essa tentativa de alterar o contexto social e estimular fisiologicamente as jovens rainhas se baseou principalmente nos trabalhos da prof^a. VERA IMPERATRIZ-FONSECA² e naqueles desenvolvidos com *Apis mellifera* por PAIN^{3,4}. O comportamento de dominância ia sendo adquirido sistematicamente pelas rainhas com o passar dos dias e quando as mesmas estavam com 12-14 dias, já completamente pigmentadas, elas foram submetidas a bioensaios de campo para analisar o potencial de atração para o machos e, posteriormente, foram analisadas quimicamente. Os resultados

² IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1973. Miscellaneous observations on the behaviour of *Schwarziana quadripunctata* (Hym., Apidae, Meliponinae). *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha* **30**: 633–640.

³ PAIN, J. 1961. Sur la phéromone des reines d’abeilles et ses effets physiologiques. *Annales de l’Abeille* **4**: 73-152.

⁴ PAIN, J. 1971. Phéromones et comportement chez quelques hyménoptères. *Apidologie* **2**: 319-355.

dessa técnica serão discutidos nos Capítulos 1 e 2. Por fim, quando a rainha virgem dominante iniciava as agressões meu monitoramento sobre a “mini-colônia” foi quase que constante, pois, se eu não a removesse a tempo ela matava a subordinada ou ambas acabavam ficando seriamente feridas.

Finalmente, eu fiz diversas tentativas de introduzir as jovens rainhas em colônias órfãs no Laboratório de Abelhas da USP, em São Paulo. As rainhas eram mantidas por 2-3 dias dentro de tubos de Eppendorff perfurados para permitir a passagem de ar e contato com operárias (Figura 9). Porém, todas as rainhas introduzidas ou tiveram os furos dos tubos fechados com cera, o que as matava por sufocação ou, se elas eram liberadas a tempo, morriam atacadas. Encontrei muitas vezes essas rainhas mortas sobre os lixos, possivelmente mortas pelas operárias ou privadas de da trofaláxis com as operárias. A introdução de rainhas virgens *in vitro* tem uma taxa de sucesso muito baixa (PRATO, 2010) e essa lacuna deve ser investigada para avanço da meliponicultura.

Figura 9. Rainha virgem de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) dentro de tubo Eppendorff criada *in vitro*. Tentativa de introdução em uma colônia órfã.

Localização de ninhos naturais, racionais e em processo de fundação

Na Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto (Figura 10), há cerca de 250 ninhos de *Tetragonisca angustula* catalogados como vivos (ativos) dentro do *campus*, de acordo com o site <http://rge.fmrp.usp.br/ninhos/login.php>, mantido pelo Prof. Dr. ADEMILSON SPENCER EGEA SOARES do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da mesma instituição. A maior parte dos ninhos é natural, situados geralmente em troncos ocos de árvores ou em alvenaria. Há também, muitos ninhos criados em caixas racionais dentro dos meliponários. Os dados do site, acima, foram salvos em *.txt e, posteriormente, foram transferidos para o programa Garmin eTrex®. Após isso, foi feita uma busca dentro do *campus* dos ninhos pré-selecionados utilizando um aparelho de GPS.

Figura 10. Vista aérea do *campus* da Universidade de São Paulo, município de Ribeirão Preto, São Paulo, a 5 Km de altura. Fonte GoogleEarth.

Muitos ninhos estavam em local de difícil acesso, ou não foram detectados em campo ou mesmo estavam mortos. Assim, foi feita uma busca ativa por toda a extensão do *campus* a fim de localizar mais ninhos naturais. Desse modo, novos ninhos foram encontrados contrabalançando a não detecção de alguns ninhos pré-selecionados.

Adicionalmente, foram instalados no *campus* da USP, em Ribeirão Preto, 92 ninhos-armadilha sempre muito próximos do solo (Figura 11), além de encontrarmos 42 ninhos naturais e cerca de 15 ninhos em colméias racionais. Todos esses ninhos foram georreferenciados e, as operárias guardas ou fundadoras (Figuras 12 e 13) foram coletadas para análise química ou molecular (Capítulo 4; Anexo – Tabela 2). As coordenadas geográficas dos ninhos naturais (identificados como CHNR), dos ninhos-armadilha (identificados como CHA) e dos ninhos racionais (diferentes nomes) estão em anexo, Tabela 8. Também foram instalados 25 ninhos-armadilha no *campus* da USP em São Paulo, porém, com exceção de um ninho que enxameou, todos os outros foram removidos ou roubados.

Os ninhos-armadilha instalados em Ribeirão Preto foram monitorados a cada 15 ou 30 dias e constatada a presença de operárias escoteiras ou fundadoras, tais ninhos eram monitorados em intervalos de tempo menores. Importante lembrar que inicialmente eu perdi muitos ninhos que estavam em estágio inicial de fundação porque eu coletava as operárias antes de um período crítico de escolha pelos indivíduos da colônia-mãe. Possivelmente, esta perturbação desestabilizava o processo de enxameagem e as operárias abandonavam a fundação.

Figura 11. Ninho-armadilha instalado dentro do *campus* da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto. Os ninhos eram colocados preferencialmente próximos do solo cuja copa da árvore provia sombra ao longo de todo o dia. Porém, dependendo da estação do ano essas armadilhas tiveram que ser reposicionadas ou realocadas para outras árvores.

Figura 12. Processo inicial da enxameagem. Operárias fundadoras de *Tetragonisca angustula* em ninho-armadilha. Essas operárias permanecem o dia inteiro na entrada do ninho vibrando as asas e somente deixam o ninho no fim do dia.

Figura 13. Processo mais avançado da enxameagem. Operárias fundadoras de *Tetragonisca angustula* em ninho-armadilha. Após alguns dias, mais operárias se unem à fundação e elas então selam a entrada do ninho deixando somente um orifício de entrada para aquelas que estão fazendo a manutenção interna do ninho ou trazendo cerume da colônia-mãe.

Durante o processo de enxameagem em *T. angustula*, os machos aparecem antes da chegada das rainhas virgens (NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES 1998). Porém, eu não tive a oportunidade de registrar a chegada de nenhuma rainha virgem aos ninhos em fundação. Talvez minha intensa manipulação na coleta de machos e operárias, de algum modo, afetou a migração de rainhas. Ocorreu, também, de eu perder a migração da rainha devido o processo de enxameagem ter sido muito rápido, em questão de poucos dias, antes de meu monitoramento mensal. Algumas fundações de ninhos, porém, foram registradas (Anexo - Tabela 2).

Verificação da presença de machos de *Tetragonisca fiebrigi*

A espécie *T. angustula* é muito parecida morfológicamente com *T. fiebrigi*. A primeira tende a ter o mesepisterno enegrecido e a última o mesepisterno amarelado. Porém, pode haver híbridos ou mesmo aquelas com alteração na cor da abelha de outra espécie. Desse modo, foi feita uma busca de possíveis ninhos de *T. fiebrigi* presentes dentro do *campus* pelo site <http://rge.fmrp.usp.br/ninhos/login.php>. Nenhum ninho foi verificado e, portanto, consideramos que todas as agregações e colônias analisadas eram de *T. angustula*. Além disso, eu questioneei o Dr. JOÃO MARIA FRANCO DE CAMARGO, na época (2009), sobre como eu poderia diferenciar os machos de *T. angustula* ou *T. fiebrigi*. Ele, gentilmente, me mostrou machos de ambas os tipos armazenados em sua coleção e me ensinou que machos de *T. fiebrigi* possuem o gonocoxito da genitália assimétrica em relação aos machos de *T. angustula* e que eu poderia me basear nesse caráter para diferenciar ambas as espécies mais do que nas cores do tórax. Assim, de cada uma das agregações que foram estudadas, eu amostréi aleatoriamente 15 indivíduos de cada uma para dissecção da genitália e analisar se os mesmos eram *T. angustula* ou *T. fiebrigi*. Posso adiantar que nenhum era *T. fiebrigi*.

CAPÍTULO 1

SECREÇÕES GLANDULARES ABDOMINAIS E FONTES DE FEROMÔNIOS EM RAINHAS DE *TETRAGONISCA ANGUSTULA* (APOIDEA: MELIPONINI)

Abstract

The chemical communication in social insects is the primary means of interaction between members of a colony. Due to the complex activities and behaviors presented by the queens in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) it is possible that their chemical profiles can change according to their reproductive status. Moreover, the queens may release pheromones attractive to males. The queens of *Tetragonisca angustula* have volatile abdominal sexually attractive to males, but the glandular source of these compounds is unknown. The present study aimed to analyze chemically abdominal glands, as well as the chemical profile of the cuticular wax of virgin queens created *in vitro* and physogastric queens of *Tetragonisca angustula*. Glands dissection were made as well as aeration of volatile compounds by dynamic headspace method. Additionally, tests were made to attract males to compounds released by both types of queens. The samples were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Our results indicate that the glandular source of sexually attractive compounds found in the Dufour's glands of physogastric queens and tergal glands of virgin queens and physogastric ones. There is evidence that the compounds attractive are two esters, isopropyl hexanoate and hexyl hexanoate. The Dufour's gland of virgin queens is underdeveloped and has poorer chemical compounds. Virgin queens were represented mostly by octadecyl octadecenoate, unlike 22 esters present in the Dufour's glands from physogastric queens. Males are attracted to volatiles of both queens, but rather for those of physogastric. The behavior of males of the compounds adsorbed on the cage of queens' imprisonment suggests that more compounds are important in mediating the chemical attraction or sexually stimulate these individuals to their queens.

Keywords: *Tetragonisca angustula*, stingless bee, gyne, physogastric queen, sexual pheromones, Dufour's gland, tergal gland, cuticular waxes.

Resumo

A comunicação química em insetos sociais é o principal meio de interação entre os membros de uma colônia. Devido às complexas atividades e comportamentos apresentados pelas rainhas em abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Meliponini) é possível que seus perfis químicos mudem de acordo com seus status reprodutivos. Além disso, as rainhas podem liberar feromônios atrativos para os machos. As rainhas de *Tetragonisca angustula* possuem voláteis abdominais sexualmente atrativos para os machos, mas a fonte glandular desses compostos é desconhecida. O presente estudo teve como objetivo analisar quimicamente as glândulas abdominais, assim como, o perfil químico da cera cuticular de rainhas virgens criadas *in vitro* e rainhas fisogástricas de *Tetragonisca angustula*. Foi feita a dissecação das glândulas e a aeração de compostos voláteis pelo método de *headspace* dinâmico. Adicionalmente, foram feitos testes de atração de machos a compostos liberados por ambos os tipos de rainhas. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Nossos resultados indicam que a fonte glandular de compostos sexualmente atrativos se encontram nas glândulas de Dufour de rainhas fisogástricas e nas glândulas tergaís de rainhas virgens e fisogástricas. Há evidências de que os compostos atrativos sejam, pelo menos, dois ésteres: hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila. A glândula de Dufour das rainhas virgens é pouco desenvolvida e pobre em compostos químicos. Ela foi representada majoritariamente por octadecenoato de octadecila, diferentemente de 22 ésteres exclusivos das glândulas de Dufour das rainhas fisogástricas. Os machos são atraídos para voláteis de ambas as rainhas, mas preferencialmente para aqueles das fisogástricas. O comportamento dos machos diante dos compostos adsorvidos nos recipientes de aprisionamento das rainhas sugere que mais compostos sejam importantes em mediar a atração química ou estimular sexualmente esses indivíduos às suas rainhas.

Palavras-Chave: *Tetragonisca angustula*, abelhas sem ferrão, cutícula, feromônios, glândulas de Dufour, glândula tergal, rainhas fisogástricas, rainhas virgens.

1. Introdução

As abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) são insetos eussociais de distribuição pantropical cujas rainhas virgens se acasalam durante o vôo nupcial na presença de centenas a milhares de machos agregados perto da entrada dos ninhos (MICHENER, 1946; NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR *et al.*, 1962; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000A; CORTOPASSI-LAURINO, 2007). Entretanto, no gênero *Melipona* os machos se agreguem em substratos do ambiente conhecidos como sítios de congregação de machos (VAN VEEN *et al.*, 1997; SOMMEIJER *et al.*, 2003). As rainhas de abelhas sem ferrão não realizam cópulas adicionais após o acasalamento bem sucedido com um único macho (MICHENER, 1946; NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR *et al.*, 1962) e são, portanto, essencialmente monândricas (PETERS *et al.*, 1999).

As agregações de machos perto de ninhos se formam quando está ocorrendo a substituição da rainha fisogástrica por uma rainha virgem (MICHENER, 1946; KERR *ET AL.*, 1962; CORTOPASSI-LAURINO, 2007) ou quando novos ninhos estão sendo fundados pelas operárias (NOGUEIRA-NETO, 1954; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000B). Neste último caso, os machos aparecem alguns dias antes da rainha virgem migrar e somente após a chegada dela o vôo nupcial acontece (NOGUEIRA-NETO, 1954; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998).

A sinalização química por um ou ambos os parceiros durante eventos reprodutivos em abelhas é um fenômeno bem estabelecido e amplamente distribuído filogeneticamente dentro do grupo (AYASSE *ET AL.*, 2001). Acredita-se, portanto, que feromônios sexuais liberados por rainhas virgens sejam responsáveis por atrair os machos para perto da entrada dos ninhos (ENGELS, 1987; ENGELS *ET AL.*, 1997; VERDUGO-DARDON *ET AL.*, 2011). Entretanto, sabe-se que rainhas fisogástricas de Meliponini, ou seja, aquelas rainhas acasaladas e ovipositoras, podem estimular sexualmente os machos

em determinadas situações, possivelmente, devido à liberação de compostos químicos abdominais (NOGUEIRA-NETO, 1957; SAKAGAMI & LAROCA, 1963; IMPERATRIZ-FONSECA, 1973; CAMPOS & MELO, 1990), muito embora os machos possam ter alguma capacidade de discriminação química de rainhas virgens daquelas já acasaladas (THOMAS, 2011; VERDUGO-DARDON *ET AL.*, 2011).

Recentemente foram registrados na porção abdominal de rainhas virgens e fisogástricas da espécie de abelha sem ferrão, *Tetragonisca angustula*, três ésteres identificados como hexanotato de isopropila (HI), hexanoato de butila (HB) e hexanoato de hexila (HH) (FIERRO *ET AL.*, 2011). O primeiro desses compostos, HI, parece ser um composto bastante atrativo para os machos dessa espécie evidenciando que as rainhas fisogástricas, de fato, podem estimular sexualmente os machos por semioquímicos (FIERRO *ET AL.*, 2011). Além disso, demonstra que, além de possíveis compostos presentes nas glândulas mandibulares das rainhas sem ferrão que atuam como feromônios sexuais (ENGELS & ENGELS, 1987; ENGELS *ET AL.*, 1997; FLACH *ET AL.*, 2006; VERDUGO-DARDON *ET AL.*, 2011), outras porções corporais e mesmo outras classes de compostos químicos também possuem papel atrativo.

De fato, as glândulas mandibulares de rainhas podem ser fontes de feromônios sexuais, como já foram descritas para outras espécies de abelhas eussociais comercialmente criadas, *Apis mellifera* (Apini) (GARY, 1962; BUTLER & FAIREY, 1964; PAIN & RUTTNER, 1963) e *Bombus terrestris* (Bombini) (KRIEGER *ET AL.*, 2006). Porém, a identificação de compostos abdominais que possuem papéis secundários, mas importantes, na biologia reprodutiva dessas abelhas têm recebido pouca atenção (BUTLER, 1971; KRIEGER *ET AL.*, 2006; VERDUGO-DARDON *ET AL.*, 2011).

As glândulas abdominais das fêmeas de abelhas de eussociais são representadas principalmente por glândulas tegumentares epiteliais dispostas dorsalmente sob os

tergitos (ABDALLA *ET AL.*, 2005; CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 2005) e pela glândula de Dufour. A glândula de Dufour é uma glândula acessória do aparelho reprodutor (ovipositor) que é mais desenvolvida em rainhas fisogástrias que nas virgens (ABDALLA *ET AL.*, 1999; ABDALLA, 2006).

Morfológica e histologicamente, as glândulas abdominais (tergais e de Dufour) das rainhas de abelhas sem ferrão são bem conhecidas. Por exemplo, é sabido que o grau de desenvolvimento de ambos os tipos de glândulas é maior nas rainhas fisogátricas que nas virgens (CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 1980; ABDALLA *ET AL.*, 2005; CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 2005; ABDALLA, 2006; CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 2006).

Entretanto, poucos estudos têm analisado quimicamente estas glândulas abdominais nas rainhas de Meliponini, conhecendo, no entanto, que a glândula de Dufour de rainhas fisogátricas é distinguível das virgens especialmente pela presença e concentração de diversos ésteres (ABDALLA *ET AL.*, 2004; ABDALLA, 2006; GRAJALES-CONESA *ET AL.*, 2007).

Considerando-se que HI, encontrado na porção abdominal de rainhas virgens e fisogátricas de *T. angustula*, é responsável, pelo menos em parte, pela atração de machos (FIERRO *ET AL.*, 2011), o objetivo do presente estudo foi identificar a fonte glandular abdominal desse composto feromonal em rainhas virgens e fisogátricas desta espécie e identificar o perfil químico da cutícula de ambos os tipos de rainhas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Procedimentos experimentais gerais

Todos os solventes foram tratados com Na₂SO₄ anidro e destilados ou bidestilados. As purificações dos compostos foram realizados por cromatografia em coluna de sílica gel (Acros, 0.035-0.070 mm) e as análises cromatográficas em camada

finas foram feitas com placas sílica gel 60 F254 (Merck), e os compostos foram visualizados com luz UV (254 nm) ou borrifando solução etanólica de KMnO_4 ou solução de *p*-anisaldeído (5%), ácido acético (50 mL) e ácido sulfúrico concentrado (1 mL) seguido de aquecimento a $\sim 100^\circ\text{C}$ com soprador.

2.2. Análises de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

A análise cromatográfica (70 eV) foi conduzida no cromatógrafo Agilent 6890 acoplado a um detector de massas Hewlett-Packard 5973 equipado com um DB5 com coluna capilar de sílica (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). Os espectros de massas foi registrado na faixa de 40-600 u a 3.54 scans/s. Hélio foi utilizado como gás carreador num fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do injetor e interface do espectrômetro de massas foram mantidas a 240°C e 280°C , respectivamente. O programa de temperatura utilizado para as análises dos compostos voláteis, extratos e compostos sintéticos de 50°C , aumentando a $12^\circ\text{C}/\text{min}$ até 290°C , então mantido a 20 min.

As amostras (1 mg/mL) de um microlitro foram injetadas usando uma razão *split* 10:1 para as amostras sintéticas e modo *splitless* para as amostras naturais. Os compostos foram identificados comparando-se o espectro de massas com os espectros do banco de dados Wiley 275, assim como o índice de retenção e coeluição com padrões sintéticos.

2.3. Análises ^1H -, ^{13}C -NMR e DEPT

Foram obtidas com espectrômetro Varian INOVA 500 (499.88 MHz) equipado com prova 5 mm e utilizando solvente CDCl_3 e TMS como padrão de referência.

2.4. Insetos

As rainhas virgens de *Tetragonisca angustula* foram criadas *in vitro* (modificado de MENEZES 2010 e PRATO, 2010, não publicado) transferindo-se larvas de 1-3 dias em placas de Elisa com 50 µL de alimento larval da espécie e mantidas em incubadora a 28°C em escuro constante com a umidade relativa controlada a 100% (três primeiros dias), 90-80% com KCl por 10-12 dias e 70% até a emergência dos adultos com NaCl. As rainhas virgens que emergiam eram colocadas aos pares dentro placas de Petri contendo um favo com cria prestes a emergir, mel e pólen da própria espécie *ad libitum* e cerca de 20-30 operárias jovens.

Na idade de 12-14 dias de emergidas essas rainhas virgens se comportavam agitadamente dentro do recipiente, solicitando trofaláxis freqüentemente às suas operárias. Em cada placa de Petri sempre havia uma rainha virgem que iniciava as agressões em direção à outra rainha virgem. Os comportamentos dessas rainhas mais agressivas direcionados às operárias e à outra rainha, além da intensa agitação com vibração de asas constante e pigmentação, foram utilizados como indicativos de maturidade sexual e, portanto, estes indivíduos foram utilizados para análise química.

As rainhas fisogástricas foram obtidas de colônias ativas e, embora a idade delas não fosse conhecida, a presença de células de cria sendo construídas, a fisogastria da rainha e o desgaste alar foram utilizados como indicativos de rainhas fecundadas e ovipositoras.

2.5. Bioensaios de atração química a rainhas virgens e fisogástricas

Os bioensaios foram realizados na Universidade de São Paulo (USP), *campus* de Ribeirão Preto, durante a ocorrência de três agregações de machos pertos de ninhos ativos ou em fundação entre novembro de 2010 a maio de 2011. As observações foram

feitas entre as 11:00h e 14:00h com temperaturas acima de 25° C. Nos bioensaios, as rainhas virgens e fisogástricas foram apresentadas individualmente em gaiolas experimentais dentro das congregações de machos e, posteriormente, a uma distância de 5 metros nas seguintes condições: (1) gaiolas fechadas; (2) gaiolas semiabertas, parcialmente furadas para permitir a saída do ar interior, mas não a entrada dos machos; (3) gaiolas totalmente abertas onde as rainhas, que haviam sido aprisionadas ali, foram removidas imediatamente antes do experimento. Cada tratamento durou 2 minutos e todos os machos que foram atraídos às gaiolas foram removidos com sugador manual para não haver reamostragem dos indivíduos aos tratamentos durante o experimento. O intervalo entre um teste e outro foi de 10 minutos. Foi feito um teste estatístico não-paramétrico de Friedman para analisar as diferenças entre todos os tratamentos. O valor de *p* foi de 0.05 e o teste foi analisado no programa estatístico *BioEstat 5.0*.

2.6. Obtenção dos compostos voláteis

Os compostos voláteis foram coletados de rainhas virgens criadas *in vitro* de 12-14 dias de emergidas e rainhas fisogástricas. Os indivíduos foram analisados imediatamente após terem sido removidos das placas de Petri ou colônias, respectivamente. As placas de Petri com as rainhas virgens e as colônias foram mantidas temporariamente no Instituto de Química da Universidade de Campinas (IQ-UNICAMP) dias antes das análises a fim de otimizar o processo de coleta dos voláteis.

Os indivíduos, após a remoção, portanto, tiveram a coleta de seus voláteis ainda vivos utilizando o método de *headspace* dinâmico utilizando Porapaq-Q como adsorvente por duas horas contínuas (*N*=1, triplicata) – Figuras 1 e 2. Em seguida, os voláteis foram extraídos do adsorvente com 2 mL de hexano e 2 mL acetato de etila que foram evaporados com um sutil fluxo de nitrogênio até o volume de 30 µL. Essas

amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) utilizando heptadecano (1 mg/mL) como padrão interno. As análises foram realizadas no laboratório da Dra Anita Marsaioli, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

2.7. Quantificação de hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila dos voláteis das rainhas virgens e fisogástricas

A quantificação relativa do hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila nas amostras naturais foram feitas utilizando o método do padrão interno obtendo uma curva de calibração por CG-EM para cada éster sintético em diferentes concentrações (0.25; 0.5; 1.0; 3.0 e 5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e utilizando heptadecano como padrão interno (RAFFA *ET AL.*, 1988).

Figura 1. Metodologia de aeração de compostos voláteis por *headspace* dinâmico. Essa técnica permite comparar os compostos liberados pelo inseto daqueles presentes no ambiente externo. Posteriormente analisa-se os dois tubos com Porapak Q e identifica-se os compostos em CG-EM.

Figura 2. Detalhe da aeração de compostos voláteis por *headspace* dinâmico. Rainha virgem de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). As rainhas recém removidas das placas permanecem vários minutos agitadas dentro da redoma de vidro, vibrando as asas e inflando o abdome.

2.8. Extratos abdominais e cuticulares

Após a aeração dos compostos voláteis, as rainhas virgens e fisogástricas de *T. angustula* foram sacrificadas por resfriamento ($T = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$) e lavadas duas vezes com 1 mL de hexano destilado por 1 min para remover a cera cuticular. Os extratos hexânicos foram concentrados com um sutil fluxo de nitrogênio até o volume de 30 μL e, então, analisados em CG-EM. A fim de confirmar a presença de compostos atrativos sexuais no abdome foram feitas análises em CG-EM dos extratos abdominais de rainhas fisogástricas ($N=1$, triplicata) que foram preparadas pela maceração dos abdômes em 30 μL de acetato de etila.

2.9. Extração das glândulas de Dufour e tergaais

As rainhas virgens e fisogástricas de *T. angustula* usadas nas análises foram imediatamente removidas das placas de Petri ou colônias, respectivamente, e prontamente anestesiadas por resfriamento em freezer 9T a -18 °C durante 10 min. Após isso, esses indivíduos foram dissecados sob estereomicroscópio Quimis em placa de Petri contendo água Milli-Q com gelo seco sob a placa para impedir a perda de compostos voláteis.

As glândulas de Dufour foram individualizadas do trato reprodutivo das rainhas após remover o ducto ovariano mediano e a espermateca. Já, as glândulas tergaais (tegumentais e de cera) foram separadas removendo-se os corpos gordurosos e vísceras do trato intestinal. Os tergitos abdominais contendo essas glândulas tergaais foram, então, submetidos a análises químicas. As glândulas foram individualmente colocadas em 20 µL de acetato de etila e 5 µL e injetados por CG-EM ($N=1$, triplicata).

2.10. Índice de retenção

O cálculo do índice de retenção dos compostos identificados nos extratos foram obtidos com padrão *n*-alcano (C9 - C32) de óleo cru (50 mL) purificado por coluna cromatográfica em sílica gel (200 g) utilizando hexano destilado como eluente. Co-injeções foram feitas das amostras com padrão *n*-alcano standard (C9-C32) por GC-EM e calculados os índices de retenção através da equação linear ($y = a + bx$). Os valores obtidos foram comparados com a literatura e os índices de retenção de padrão *n*-alcanos (C9-C32) foram considerados números integradores de 900 a 3200.

2.11. Derivatizações DMDS/I₂ e síntese de compostos voláteis

As derivatizações das amostras, a síntese do hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila (Figuras 3 e 4), assim como alguns outros parâmetros químicos acima, foram feitas exclusivamente pela pesquisadora Diana Araújo (Unicamp) por exigirem um conhecimento profundo e especializado nessa área, mas citados aqui, por serem importantes para os nossos resultados e discussão.

Figura 3. (A) Estrutura química dos ésteres hexanoato de isopropila e (B) hexanoato de hexila encontrados em glândulas abdominais de rainhas virgens e fisogástricas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Figura cedida por Diana Araújo, Universidade Estadual de Campinas.

3. Resultados

3.1. Quantidade de machos atraídos

A quantidade de machos atraídos aos recipientes contendo rainhas virgens foi de 141 indivíduos, independente das gaiolas estarem semiabertas ou totalmente abertas, ou dentro das agregações ou distantes a 5 metros delas (Figura 4). Nessas mesmas condições, um total 243 machos foram atraídos às gaiolas das rainhas fisogástricas. Houve diferença significativa na quantidade de machos atraídos aos dois grupos de rainhas ($T = 7.500$; $Z = 2.471$; $p = 0.013$).

Figura 4. Quantidade de machos de *Tetragnisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) atraídos às gaiolas com rainhas virgens e rainhas fisogástricas.

3.2. Respostas dos machos aos odores de rainhas virgens e fisogástricas

Os machos ignoram ($N = 0$) as gaiolas fechadas com rainhas, embora elas pudessem ser aparentemente visualizadas porque os frascos eram transparentes (Figura 5). Mas quando aquelas gaiolas foram apresentadas semiabertas ou completamente abertas atraíram muitos machos (Figuras 6-8; Tabela 1). Houve diferença na quantidade de machos atraídos entre gaiolas semi-abertas de rainhas virgens e fisogástricas, dentro das agregações e a 5 metros de distância nos três aglomerados estudados ($Fr = 17.4722$; $p = 0.0146$).

Porém, na análise de ranqueamento feita, *a posteriori*, com o teste de Friedman verificou-se que apenas a comparação entre as gaiolas semi-abertas de rainhas virgens a 5m de distância da agregação e gaiolas abertas de rainhas fisogástricas houve variação significativa ($p < 0.05$). Os machos atraídos a ambos os tipos de gaiolas apresentam um forte estímulo sexual, principalmente após entrarem em contato com o recipiente.

Alguns indivíduos (não contabilizados) pousavam e/ou agarraram outros machos inspecionando-os vigorosamente, não havendo, no entanto, tentativas de cópula.

Tabela 1. Quantidade de machos atraídos a diferentes tratamentos com rainhas virgens (RV) e rainhas fisogástricas (RF) de *Tetragonisca angustula* (Meliponini) durante a ocorrência de agregações reprodutivas.

Agregações (n)	Machos atraídos às gaiolas											
	fechadas				semi-abertas				abertas*			
	0m		5m		0m		5m		0m		5m	
	RV	RF	RV	RF	RV	RF	RV	RF	RV	RF	RV	RF
1º	-	-	-	-	12	15	6	8	21	39	11	14
2º	-	-	-	-	17	26	7	6	26	54	5	9
3º	-	-	-	-	13	7	3	12	15	42	5	11

* rainhas virgens foram aprisionadas por 10 minutos e removidas imediatamente antes de serem apresentadas aos machos

** as gaiolas foram apresentadas dentro das agregações (0 metros) e a 5 metros de distância das mesmas.

Figura 5. Quantidade de machos de *Tetragonisca angustula* (Meliponini) atraídos às gaiolas de rainhas durante a ocorrência de agregações reprodutivas em ninhos em processo de fundação. RV = Rainha Virgem; RF = Rainha Fisogástrica. Entre parênteses: Distância das gaiolas com rainhas ou com seus odores aprisionados até as agregações de machos a zero metro (0) e a cinco metros (5). Box Plot.

3.2. Compostos adsorvidos por aeração

Dois ésteres foram liberados pelas rainhas fisogástricas (massa média da abelha = 393 mg), hexanoato de isopropila em 1.5975 μg ($R^2=0.9824$) e hexanoato de hexila em 5.1630 μg ($R^2=0.9921$), enquanto as rainhas virgens sexualmente atrativas liberaram somente hexanoato de isopropila em 0.0514 μg (massa média da abelha = 100 mg).

3.3. Extratos das ceras cuticulares

Os extratos cuticulares das rainhas virgens e fisogástricas consistiram dos *n*-alcanos (*n*-C23, *n*-C25, *n*-C27 e *n*-C29), isômeros de metil-alcanos (metil-C23, -C25, -C27, -C29 e -C31), dimetil-alcano (9,13-dimetil-C25); alcanos (C25:1, C27:1, C29:1, C31:1 e C33:1), alcadienos (C31:2 e C33:2) e cetona (nonadecanona). As rainhas virgens também apresentaram *n*-C21 (Tabela 2).

Figura 6. Bioensaio de atração química de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) a odores de uma rainha fisogástrica. Rainha aprisionada em gaiola totalmente fechada. (tampa preta) Nenhum macho atraído, mesmo que por transparência da gaiola a rainha pareça ser visível.

Figura 7. Bioensaio de atração química de machos de *Tetragonisca angustula* a odores de uma rainha fisogástrica. Rainha aprisionada em gaiola semiaberta. A tampinha branca possuía vários furos que permitam a passagem dos voláteis das rainhas, mas impediam a entrada dos machos. Muitos machos ficaram agitados e vários se dirigem para o topo da gaiola.

Figura 8. Bioensaio de atração química de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) a odores de uma rainha fisogástrica. A rainha aprisionada na gaiola foi removida e a gaiola, agora, está totalmente aberta permitindo a passagem dos voláteis e contato dos machos com outros possíveis compostos deixados pelas rainhas adsorvidos nas paredes das gaiolas. Alguns machos se dirigem para o interior da gaiola e outros disputam um lugar sobre a tampinha branca vibrando intensamente suas asas.

3.4. Extratos abdominais

Através das análises foi observado que os compostos voláteis coletados pelo método do *headspace* dinâmico estavam presentes nos abdômes das rainhas (Tabela 2). Além do hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila, os extratos abdominais das rainhas fisogástricas foram encontrados compostos de nonanol; nonadecanona; ácidos esteáricos, oléicos e linoléicos; *n*-alcanos (*n*-C21, *n*-C23, *n*-C25, *n*-C27 e *n*-C29); isômeros de metil-alcanos (metil-C23, -C25, -C27, -C29 e -C31); dimetil-alceno (9,13-dimetil-C25); alcenos (C25:1, C27:1, C29:1, C31:1 e C33:1); alcadienos (C31:2 e C33:2); e quatro esteróides (Tabela 2).

3.5. Composição das glândulas de Dufour das rainhas virgens e fisogástricas

As glândulas de Dufour das rainhas virgens, visualmente pouco desenvolvidas (Figuras 9 e 10), consistiram somente de octadecenoato de octadecila (Tabela 2). As glândulas de Dufour das rainhas fisogástricas (Figuras 11 e 12) foram compostas de ésteres, incluindo hexanoato de isopropila (0.25%) e hexanoato de exila (0.90%), com acetato de tetradecila (21.63%) e butirato de tetradecila (21.83%) como majoritários.

3.6. Composição das glândulas tergaais das rainhas virgens e fisogástricas

As glândulas tergaais de ambas as rainhas foram encontrados hexanoato de isopropila, hexanoato de hexila, nonanol, nonadecanona, *n*-alcanos (*n*-C21, *n*-C23, *n*-C25, *n*-C27 e *n*-C29), isômeros de metil-alcanos (metil-C23, -C25, -C27, -C29 e -C31), alcenos (C25:1, C27:1, C29:1, C31:1 e C33:1) e alcadieno (C31:2). Acetato de dodecila, heptadecanona e isômeros de metil-C33 foram encontrados somente nas glândulas tergaais das virgens, enquanto hexanoato de butila, 9,13-dimetil-C25 e C33:2 foram presentes somente nas glândulas tergaais das fisogástricas (Tabela 2). 2-nonadecanona foi mais representado nas tergaais das virgens (14.95%) que nas fisogástricas (3.22 %).

Figura 9. Trato reprodutivo de rainha virgem de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Santos, 2012.

Figura 10. Detalhe da espermateca e glândula de Dufour de rainha virgem de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Santos, 2012.

Figura 11. Trato reprodutivo de rainha fisogástrica de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Santos, 2012

Figura 12. Detalhe da espermateca e glândula de Dufour de rainha fisogástrica de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Santos, 2012.

4. Discussão

4.1. Compostos liberados ativamente pelas rainhas e fonte glandular

Os testes de campo desenvolvidos nas agregações de machos de *T. angustula*, perto de ninhos ativos ou em fundação, mostraram que os machos foram atraídos tanto pelas rainhas virgens como também pelas fisogástricas, conforme também foi observado por FIERRO *ET AL.* (2011). Estes pesquisadores, que utilizaram outra técnica de aeração de compostos voláteis (SPME), verificaram que as rainhas virgens de *T. angustula* foram caracterizadas por uma abundância de hexanoato de isopropila (HI), uma pequena quantidade de hexanoato de butila (HB), e traços de hexanoato de hexila (HH). As pequenas quantidades HB e HH liberadas ativamente pelas rainhas virgens (FIERRO *ET AL.*, 2011) podem ser uma explicação do porquê o presente estudo ter encontrado somente o HI nas rainhas virgens pelo método de aeração *headspace* dinâmico que é realizado com um único indivíduo de cada vez. O mesmo vale para a pequena quantidade de HB liberado ativamente pelas rainhas fisogástricas (FIERRO *ET AL.*, 2011) justificando nossos resultados em termos encontrado somente HI e HH nessas rainhas.

O presente trabalho demonstrou que hexanoato de isopropila, caracterizado como potencial atrativo sexual para os machos de *T. angustula* (FIERRO *ET AL.*, 2011), está armazenado tanto na glândula de Dufour de rainhas fisogástricas, como nas tergaís de ambas rainhas, virgens e fisogástricas. Portanto, embora a porção abdominal das rainhas em abelhas sem ferrão venha recebendo um papel secundário quando se trata de analisar possíveis compostos atrativos para os machos (CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 1980; ENGELS & ENGELS, 1987; FLACH *ET AL.*, 2006; VERDUGO-DARDON *ET AL.*, 2011), pudemos demonstrar que as glândulas de Dufour e as tergaís armazenam compostos de interesse para os machos como, inclusive, havia sido preconizado por CAMPOS E MELO (1990).

No entanto, não se descarta a possibilidade das secreções das glândulas mandibulares das rainhas de *T. angustula* serem fontes primárias de compostos atrativos para machos, como observado para rainhas de outras espécies de abelhas sem ferrão (ENGELS, 1987; ENGELS & ENGELS, 1987; FLACH *ET AL.*, 2006; VERDUGO-DARDON *ET AL.*, 2011).

Devido ao fato dos hexanoatos de isopropila e hexila estarem presentes nas glândulas de Dufour e tergaís da rainha fisogástrica, é possível que estes compostos estejam sendo capturados da hemolinfa desses insetos e armazenados nestas glândulas abdominais. Indícios para essa hipótese vêm de estudos realizados com outras espécies de abelhas eussociais onde se acredita que determinados compostos encontrados em diferentes glândulas abdominais do mesmo indivíduo sejam tomados dos fluidos corporais, hemolinfa, dessas abelhas (ABDALLA *ET AL.*, 1999; CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 2005; ABDALLA, 2006).

4.2. Glândulas abdominais participam juntas na liberação de voláteis atrativos para os machos?

Embora ambas as glândulas abdominais (tergaís e de Dufour) da rainha fisogástrica armazenem o hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila, não é possível afirmar, neste momento, qual delas ou se ambas são responsáveis pela liberação ativa desses compostos atrativos aos machos durante os experimentos. Porém, a constatação de que as rainhas virgens parecem apresentar já uma pequena porcentagem de hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila somente nas glândulas tergaís sugere-se, então, que as glândulas tergaís das rainhas fisogásticas sejam, de fato, as responsáveis pela liberação o HI e HH.

Outra importante indicação para esta possibilidade é que no momento da coleta de compostos voláteis pelo método de aeração observou-se que ambas as rainhas ficavam muito agitadas e inflavam o abdome periodicamente, batendo as asas de modo agitado aparentando liberar compostos voláteis das glândulas tergaes.

4.3. Compostos não-voláteis das rainhas poderiam estimular o comportamento sexual dos machos?

Os ésteres (HI e HH) identificados no trabalho atual e por FIERRO *E COL.* (2011) parecem ser responsáveis apenas pela aproximação dos machos até as rainhas e não por estimular a cópula. Nossos tratamentos com rainhas aprisionadas permitindo apenas a passagem dos seus odores demonstram que outros compostos possivelmente estejam sendo responsáveis por estimular sexualmente os machos durante as agregações.

Em nossos tratamentos pudemos verificar que os machos atraídos às gaiolas totalmente abertas se comportavam visualmente mais agitados que aqueles que interagiam com as gaiolas semiabertas. Nesse último caso, os machos estavam tendo acesso somente aos voláteis passando pelos furos das gaiolas e pareciam ir investigar o substrato. Mas, nas gaiolas totalmente abertas, os machos entravam em contato direto com lipídios cuticulares deixados pelas rainhas. Quando contactando as paredes das gaiolas, os machos inspecionavam vigorosamente até outros machos que entravam no recipiente e, por vezes, montavam sobre eles. Porém, não foi observada qualquer tentativa de copular com eles ou eversão da genitália. Portanto, lipídios cuticulares deixados pelas rainhas podem ter sido outros precursores desencadeando a série de comportamentos dos machos após sua apresentação.

Os lipídios cuticulares nos insetos possuem função primordial por protegê-los da dessecação. Porém, estes compostos evolutivamente vem assumindo outros papeis,

principalmente nos insetos sociais, porque mediam a comunicação química entre eles (BLUM, 1972; SINGER, 1998). Dependendo do perfil químico do indivíduo, por exemplo, é possível mesmo categorizá-lo de acordo com a espécie a que pertence, castas e sexos (ABDALLA *ET AL.*, 2003; KERR *ET AL.*, 2004; NUNES *ET AL.*, 2008, 2009; PIANARO *ET AL.*, 2009; NUNES *ET AL.*, 2010). Contudo, embora haja toda essa potencial capacidade discriminatória entre os indivíduos, não sabemos porque os machos de *T. angustula* são atraídos e se acasalam também com suas rainhas fisogástricas. Uma sugestão é que o gatilho feromonal emitido pelas rainhas seja tão forte que impeça, pelo menos nesses momentos, os machos de discriminarem quimicamente o status reprodutivo das rainhas fisogástricas. Porém, mais pesquisas devem ser conduzidas a fim de responder esta questão.

4.4. Significado biológico potencial do hexanoato de isopropila (HI)

Os resultados encontrados no presente estudo e aqueles apresentados por FIERRO *E COL.* (2011) demonstram que o hexanoato de isopropila possui um importante papel no comportamento reprodutivo dos machos de *T. angustula*, embora outros compostos cuticulares abdominais, aqui identificados, possam ter funções adicionais. Independente disso, porém, o modo de obtenção desse composto volátil, HI, e a subsequente observação de atração dos machos aos tratamentos com rainhas virgens e fisogástricas nos dois trabalhos nos oferecem indícios para outras possíveis atuações e significados biológicos deste componente.

Por exemplo, por que as rainhas fisogástricas possuem e liberam um composto que atrai os machos para a cópula uma vez que já estão acasaladas e possuem um estoque de esperma para toda a vida? Uma possível resposta para esta pergunta pode ser que, devido à ampla complexidade comportamental que os insetos sociais apresentam

dentro de suas colônias, as rainhas estejam utilizando compostos químicos idênticos de forma isolada ou conjunta para se interagir em diferentes contextos sociais (BLUM & BLAND, 1972). As abelhas melíferas, *Apis mellifera*, ilustram bem esse cenário. O principal feromônio sexual nessa espécie é o ácido 9-oxo-2-decenóico (9ODA), que está presente majoritariamente nas glândulas mandibulares de rainhas virgens (GARY, 1962), mas também é encontrado nas rainhas fisogástricas (PAIN & RUTTNER, 1963; BUTLER & FAIREY, 1964). Após as rainhas virgens utilizarem esse composto para atrair os machos nas áreas de congregação (ambiente externo), elas, agora fecundadas, utilizam esse feromônio (9ODA) para desempenhar diferentes interações com suas operárias dentro do ninho (PAIN & BABIER 1963).

É possível, portanto, que alguns dos compostos liberados pelas rainhas de *T. angustula* tenham funções contexto-dependente e, no caso específico, fortemente sugere comunicado de alarme para a colônia. Essa conclusão se baseia no fato de que, quando as rainhas foram removidas do seu contexto social (“mini-colônias” ou ninhos ativos), a primeira coisa que elas tentaram fazer foi se refugiarem. Como essa opção não lhes foi dada, elas ficaram extremamente agitadas, vibrando as asas e inflando o abdome, como já descrito durante as coletas dos compostos voláteis por aeração. Tal comportamento parece, assim, ser uma solicitação de ajuda ou tentativa de alarmar suas operárias de que o ninho está sendo perturbado, mais do que aparentando qualquer interesse sexual nesse momento de estresse.

Trabalhos anteriores com outras espécies de abelhas sem ferrão já haviam apontado que a atração sexual incidental de machos para as rainhas virgens (CORTOPASSI-LAURINO, 1979) ou fisogástricas ocorreu em momentos de perturbação do ninho (NOGUEIRA-NETO, 1957; SAKAGAMI & LAROCA, 1963; IMPERATRIZ-FONSECA, 1973). Embora os machos estejam interpretando uma sinalização química feita pelas rainhas

aparentemente para suas operárias, o fato de que as rainhas fisogástricas podem ser seriamente machucadas ou mortas após cópulas adicionais (CAMPOS & MELO, 1990) é outro indício de que o contexto da liberação dos odores atrativos tenha outra função biológica do que atrair os machos.

4.5. Octadecenoato de octadecila em glândulas de Dufour de rainhas virgens

As glândulas de Dufour das abelhas são uma das principais glândulas envolvidas na produção de feromônios sexuais nas abelhas (AYASSE *ET AL.*, 2001) e no caso das abelhas sem ferrão elas são mais desenvolvidas (CRUZ-LANDIM *ET AL.* 1980; CRUZ-LANDIM *ET AL.* 2005) e ricas em compostos (ABDALLA *ET AL.* 2004; GRAJALES-CONESA *ET AL.* 2007) nas rainhas fisogástricas. Assim, o octadecenoato de octadecila encontrado majoritariamente nas glândulas de Dufour das rainhas virgens de *T. angustula* e exclusivo delas seria ele um composto “marcador” de rainha virgem nessa espécie? Ou seja, suas operárias reconheceriam as rainhas virgens por meio desse composto? No momento é difícil responder essas perguntas. Assim, sugerimos que trabalho futuros investiguem a função biológica desse composto tanto para as operárias quanto para os machos.

Em suma, as glândulas tergaais de rainhas virgens atrativas e rainhas fisogástricas de *T. angustula*, além das glândulas de Dufour das rainhas fisogástricas, são as fontes de compostos atrativos para os machos. As glândulas de Dufour das rainhas virgens são compostas, exclusivamente, por octadecenoato de octadecila, composto sem função biológica conhecida nessa espécie. O comportamento dos machos quando entram em contato com compostos das ceras cuticulares das rainhas virgens e fisogástricas sugerem que outros componentes atuem conjuntamente na estimulação sexual dos machos.

Tabela 2. Compostos químicos encontrados nas glândulas de Dufour, tergaís e cutícula de rainhas virgens e rainhas fisogástricas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Colaboração com a pesquisadora Diana Araújo, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

No.	Compostos	IR (calc.)	IR (lit.)	Glândula de Dufour		Glândula tergal		Cutícula	
				virgem	fisogástrica	virgem	fisogástrica	virgem	fisogástrica
1	Heneicosano ^d	2100	2100	-	-	0,66±0,15	0,33±0,09	0,20±0,28	-
2	Tricosano ^d	2300	2300	-	0,96±1,35	3,89±1,61	10,27±1,51	8,08±1,60	11,87±3,01
3	Pentacosano ^d	2500	2500	19,22±15,31	1,92±3,33	44,82±4,87	5,15±1,63	20,03±3,83	6,26±8,84
4	Heptacosano ^d	2700	2700	-	2,38±4,12	7,31±3,73	5,64±2,31	173±2054	16,72±3,99
5	Nonacosano ^d	2900	2900	-	-	0,23±0,23	1,06±0,73	2,58±0,56	2,73±0,82
Metil-alcanos									
6	9-, e 11-metil-tricosano ^c	2338	-	-	-	0,42±0,24	2,39±1,53	0,65±0,10	2,52±0,98
7	9-, 11-, e 13-metil-pentacosano ^c	2536	-	-	-	1,15±0,71	2,37±1,15	1,04±0,05	1,76±0,61
8	9-, 11-, e 13-metil-heptacosano ^c	2735	-	-	-	0,58±0,18	1,90±0,39	0,91±0,06	4,46±3,43
9	9-, 11-, 13-, e 15-metil-nonacosano ^c	2935	-	-	-	0,09±0,15	2,72±0,81	0,50±0,32	4,38±2,45
10	11-, 13-, e 15-metil-hentriacontano ^c	3133	-	-	-	0,47±0,43	4,27±1,15	0,70±0,95	4,25±0,47
Alcenos									
11	Heneicoseno	-	-	-	-	0,10±0,16	-	-	-
12	Tricoseno	-	-	-	-	0,11±0,18	0,39±0,34	-	-
13	9-, 10-, 11- e 12-Pentacoseno ^c	2471	-	-	-	2,46±1,07	2,56±1,73	3,12±2,17	6,19±7,54
14	9-, 10-, 11-, 12- e 13-Heptacoseno ^c	2671	-	-	-	2,94±1,05	0,82±0,41	2,11±1,59	0,63±0,90
15	10-, 11-, 12-, 13- 14-Nonacoseno ^c	2876	-	-	-	3,11±2,04	6,06±3,17	6,51±1,58	3,62±0,32
16	Hentriacontadieno	3048	-	-	-	1,37±1,51	12,77±3,48	10,13±3,83	6,76±0,13
17	10-, 11-, 12-, 13- 14- e 15- Hentriaconteno ^c	3097	-	-	-	4,43±2,59	19,84±9,88	13,21±4,29	11,84±1,78
18	Tritriacontadieno	3286	-	-	-	-	11,52±3,11	2,76±3,91	6,95±2,13
19	11-, 12-, 13- 14-, 15- e 16- Tritriaconteno ^c	3312	-	-	-	-	3,41±1,84	1,04±1,47	1,98±1,77

Dimetil-alcanos

20	9,13-dimetil-pentacosano	2564	-	-	-	-	0,48±0,56	0,54±+I520,15	0,22±+J520,32
----	--------------------------	------	---	---	---	---	-----------	---------------	---------------

Álcool

21	Nonanol	1169	1171	-	-	0,03±0,05	1,33±+H541,28	-	-
----	---------	------	------	---	---	-----------	---------------	---	---

Cetonas

22	2-nonadecanona	2104	2106	-	0,24±0,25	14,95±+G29,26	3,22±1,81	4,57±2,12	1,07±0,89
----	----------------	------	------	---	-----------	---------------	-----------	-----------	-----------

Ésters

23	Hexanoato de etila	-	-	-	0,10±0,13	-	-	-	-
----	--------------------	---	---	---	-----------	---	---	---	---

24	Hexanoato de isopropila ^d	1035	1040	-	0,25±0,20	0,03±0,06	0,33±0,36	-	-
----	--------------------------------------	------	------	---	-----------	-----------	-----------	---	---

25	Hexanoato de butila	1188	1188	-	0,64±0,13	-	0,03±0,05	-	-
----	---------------------	------	------	---	-----------	---	-----------	---	---

26	Hexanoato de hexila ^d	1383	1352	-	0,90±0,85	0,10±0,14	1,16±+H71,26	-	-
----	----------------------------------	------	------	---	-----------	-----------	--------------	---	---

27	Acetato de decila	-	1408	-	0,08±0,11	-	-	-	-
----	-------------------	---	------	---	-----------	---	---	---	---

28	Dodecanoato de etila	-	1595	-	0,05±0,07	-	-	-	-
----	----------------------	---	------	---	-----------	---	---	---	---

29	Acetato de dodecila	1603	1609	-	14,13±6,86	0,13±0,19	-	-	-
----	---------------------	------	------	---	------------	-----------	---	---	---

30	Dodecanoato de isopropila	1623	-	-	1,76±1,73	-	-	-	-
----	---------------------------	------	---	---	-----------	---	---	---	---

31	Dodecanoato de butila+butirato de dodecila	1783	-	-	6,12±2,16	-	-	-	-
----	--	------	---	---	-----------	---	---	---	---

32	Acetato de tetradecenila	-	1807	-	0,47±0,66	-	-	-	-
----	--------------------------	---	------	---	-----------	---	---	---	---

33	Acetato de tetradecila	1805	1811	-	21,63±5,13	-	-	-	-
----	------------------------	------	------	---	------------	---	---	---	---

34	Tetradecanoato de isopropila	-	1814	-	0,11±0,16	-	-	-	-
----	------------------------------	---	------	---	-----------	---	---	---	---

35	Hexanoato de dodecila	1978	-	-	14,91±4,65	-	-	-	-
----	-----------------------	------	---	---	------------	---	---	---	---

36	Butirato de tetradecila	1985	-	-	21,83±3,98	-	-	-	-
----	-------------------------	------	---	---	------------	---	---	---	---

37	Acetato de hexadecila	2004	2009	-	0,95±0,75	-	-	-	-
----	-----------------------	------	------	---	-----------	---	---	---	---

38	Hexanoato de tetradecila	2177	-	-	5,72±2,69	-	-	-	-
----	--------------------------	------	---	---	-----------	---	---	---	---

39	Butirato de hexadecila	2183	-	-	1,03±0,97	-	-	-	-
----	------------------------	------	---	---	-----------	---	---	---	---

40	Hexanoato de hexadecila	2373	-	-	0,14±0,15	-	-	-	-
----	-------------------------	------	---	---	-----------	---	---	---	---

41	Dodecanoato de dodecila	2565	-	-	1,69±1,11	-	-	-	-
----	-------------------------	------	---	---	-----------	---	---	---	---

42	Dodecanoato de tetradecila	-	-	-	0,85±0,69	-	-	-	-
43	Tetradecanoato de tetradecila	2764	-	-	0,11±0,15	-	-	-	-
44	Octadecenoato de octadecila	2803	-	67,34±24,73	-	-	-	-	-
Compostos desconhecidos		-	-	13,44	1,10	-	-	4,00	5,79
Total		-	-	100	100	-	-	100	100

CAPÍTULO 2

EXTRATOS CEFÁLICOS DE RAINHAS VIRGENS E FISOGÁSTRICAS DE *TETRAGONISCA ANGUSTULA* (MELIPONINI): PERFIL QUÍMICO E BIOENSAIO

Abstract

The queens of social insects have different chemical compounds that can mediate the interaction with their workers or their sexual partners. Among the various glands that potentially have the chemicals of interest for their workers or partners, the cephalic glands (labial and mandibular) of queens is one. To test the hypothesis that the compounds present in cephalic glands of queens and males are attractive to workers, this study analyzed the chemical profile of cephalic extracts of virgin and physogastric queens of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini). The virgin queens were created *in vitro*, and physogastric queens removed from active colonies. Cephalic extracts of queens were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. After compounds identification, natural cephalic extracts of these queens were offered to males nearby aggregations of swarming nests. Chemical analysis of the extracts indicates that the cephalic queens physogastric of *T. angustula* have 23 chemical compounds: three alkanes, five methyl-alkanes, six alkenes, one dimetilalcane, three carboxylic acids, one ketone, and four steroids. The virgin queens had their cephalic extracts represented by only one alcohol (nerol). The bioassay's results demonstrate that male and foundresses workers of *T. angustula* do not respond to compounds present in of the head of virgin and physogastric queens. The wealth of compounds in the extracts of cephalic physogastric queens is consistent with the greater number of activities and interactions within the nest. It is possible that the cephalic compounds demonstrated unattractive for males and workers outside the nest have some significance inside the nest, but this hypothesis needs to be confirmed. Males and workers outside the nest also ignored the nerol present in cephalic extracts of sexuality attractive virgin queens. Bioassays in other social contexts may elucidate the biological significance of nerol in virgin queens of *T. angustula*.

Key-words: cephalic glands, nerol, queens, social bees.

Resumo

As rainhas de insetos sociais possuem diversos compostos químicos que podem mediar a interação com suas operárias ou com seus parceiros sexuais. Das diversas glândulas que potencialmente apresentam compostos químicos de interesse para seus companheiros ou parceiros, as glândulas cefálicas (labiais e mandibulares) boas candidatas. Para testar a hipótese de que os compostos presentes em glândulas cefálicas de rainhas sejam atrativos para machos e operárias, o presente estudo analisou o perfil químico de extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini). As rainhas virgens foram criadas *in vitro* e as rainhas fisogástricas removidas de colônias ativas. Extratos cefálicos das rainhas foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Identificados os compostos, os extratos cefálicos naturais dessas rainhas foram oferecidos a machos agregados pertos de ninhos em processo de fundação. A análise química dos extratos cefálicos indica que as rainhas fisogástricas de *T. angustula* possuem 23 compostos químicos: 3 alcanos, 5 meil-alcanos, 6 alcenos, 1 dimetilalcano, 3 ácidos carboxílicos, 1 cetona e 4 esteróides. As rainhas virgens tiveram seus extratos cefálicos representados somente por nerol (92%), dentre um pequena porcentagem desconhecida. Nossos bioensaios comportamentais demonstram que machos e operárias fundadoras de *T. angustula* não respondem aos compostos presentes nas cabeças das rainhas virgens e fisogástricas. A grande riqueza de compostos nos extratos cefálicos das rainhas fisogástricas está de acordo com a maior quantidade de atividades e interações dentro do ninho. É possível que os compostos cefálicos demonstrados não atrativos para machos e operárias fora do ninho tenham algum significado dentro do ninho, mas essa hipótese precisa ser confirmada. O nerol presente nos extratos cefálicos das rainhas virgens atrativas sexualmente também foi ignorado por machos e operárias fora do ninho. Bioensaios em outros contextos sociais podem elucidar o significado biológico do nerol em rainhas virgens de *T. angustula*.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão, glândulas cefálicas, nerol, rainhas.

1. Introdução

As abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) são insetos eussociais avançados com sobreposição de gerações, cuidado com a prole e divisão reprodutiva de trabalho (MICHENER, 1974). Essa divisão de trabalho ocorre entre as castas femininas de operárias e rainhas. As operárias são responsáveis pelas tarefas de forrageamento, manutenção do ninho e cuidado com a prole (MICHENER, 1974; SAKAGAMI, 1982). Por outro lado, o papel reprodutivo dentro das colônias de abelhas sem ferrão é exercido majoritariamente por uma única fêmea reprodutiva (TÓTH *ET AL.*, 2002), ou seja, uma rainha acasalada e ovipositora, denominada de rainha fisogástrica.

A aquisição do *status* de rainha fisogástrica pelas rainhas virgens se dá de modo gradual, mas intenso, por meio de um rigoroso processo de seleção pelas operárias da colônia. Em suma, alguns dias após as jovens rainhas emergirem, elas vão se tornando progressivamente agitadas, vibram periodicamente as asas e inflam o abdome com frequência. Iniciam uma constante interação com as operárias, principalmente em relação à trofalaxia e, se outras rainhas estiverem presentes, um certo antagonismo entre elas (NAVES DA SILVA *ET AL.*, 1972; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI 1995; NOGUEIRA-FERREIRA *ET AL.*, 2009; TRABALHO ATUAL). À medida que essas rainhas virgens vão adquirindo maturidade sexual começa a haver uma hierarquia entre elas sendo que aquelas mais atrativas para as operárias, se não forem mortas pelas mesmas, substituirão a rainha-mãe ou enxamearão para um novo ninho sendo fundado por operárias (NAVES DA SILVA *ET AL.*, 1972; ENGELS & IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995; NOGUEIRA-FERREIRA *ET AL.*, 2009). Há ainda uma terceira alternativa onde jovens rainhas podem deixar seus ninhos de origem e invadir colônias intraespecíficas órfãs como estratégia para não serem mortas (WENSELEERS *ET AL.*, 2011).

Após apresentar comportamentos passíveis de serem escolhidas pelas operárias (acima citado), as jovens rainhas terão que ser bem sucedidas em uma última avaliação antes de serem aceitas, isto é, terão que se acasalar com sucesso. O acasalamento ocorre ao ar livre, fora do ninho, durante o voo nupcial da jovem rainha na presença de dezenas a centenas de machos, geralmente, agregados nas proximidades das colônias coespecíficas (MICHENER, 1946; NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR *ET AL.*, 1962; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; CORTOPASSI-LAURINO, 2007). Somente um macho se acasala com a rainha porque o mesmo bloqueia mecanicamente o trato reprodutivo feminino com um *plug* de acasalamento durante a cópula, ou seja, porções quitinizadas de sua própria genitália que evertem e se desprendem de seus corpos acoplando-se na abertura genital das rainhas (KERR & KRAUSE, 1950). Poucos dias após terem sido fecundadas, as rainhas iniciam a postura e, acompanhando suas novas atividades, o perfil químico de suas glândulas se altera drasticamente (ENGELS *ET AL.*, 1993; ABDALLA *ET AL.*, 2004; GRAJALES-CONSESA *ET AL.*, 2007).

A comunicação química entre os insetos sociais, dentre eles, as abelhas sem ferrão, é o principal meio de interação entre os membros de uma colônia (WILSON, 1965; BILLEN, 2006). A fonte desses compostos químicos nas abelhas sem ferrão se encontra principalmente em glândulas exócrinas espalhadas ao longo de todo o corpo desses insetos. Essas glândulas podem ser, por exemplo: as cefálicas (mandibulares e labiais), as abdominais (Dufour e tergaes) ou mesmo tarsais (CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 2005). Entre as rainhas, aquelas fisogástricas tendem a possuir as glândulas exócrinas mais desenvolvidas morfológica e quimicamente que as virgens refletindo o aumento de complexidade das novas atividades e interações assumidas nesta fase da vida (CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 1990; CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 2005).

A comunicação química por parte das rainhas dentro do ninho possui papel integrador importante para os membros da colônia, embora a natureza desta sinalização como controle feromonal ou pistas honestas de fecundidade para as operárias seja uma questão discutível (KELLER & NONACS, 1993). Fora dos ninhos, as rainhas (virgens no caso) também podem se comunicar, com os machos desencadeando nestes comportamentos de buscas por parceiras sexuais atrativas e recepcionais e subsequente cópula.

Por exemplo, em *Apis mellifera* (Apini) e *Bombus terrestris* (Bombini), as glândulas mandibulares das rainhas virgens são importantes fontes de feromônios sexuais (GARY, 1962; BUTLER & FAIREY, 1964; PAIN & RUTTNER, 1963; KRIEGER ET AL., 2006). Entre as abelhas sem ferrão, apesar da grande diversidade e riqueza de espécies (CAMARGO & PEDRO, 1992), poucos estudos têm sido conduzidos para se determinar os constituintes químicos de glândulas cefálicas das rainhas (ENGELS ET AL., 1993; GRAJALES-CONESA ET AL., 2007). Destes trabalhos, somente as rainhas do gênero *Scaptotrigona* tiveram suas glândulas cefálicas (extratos) analisadas determinando-se nas rainhas virgens a presença de álcoois com papel significativo na atração de machos (ENGELS ET AL., 1990; FLACH ET AL., 2006; VERDUGO-DARDON ET AL., 2011).

Embora as rainhas passem a maior parte de seus ciclos de vida dentro das colônias, seria interessante analisar se determinados grupos de indivíduos apresentam respostas de interesse a compostos presentes em suas glândulas cefálicas fora dos ninhos. Indivíduos fora dos ninhos, como operárias guardas, respondem muito prontamente a feromônios de alarme enquanto os machos respondem a feromônios sexuais. Não sabemos, ainda, se possíveis compostos presentes nas glândulas cefálicas de rainhas virgens e atrativas de *T. angustula* estimulam sexualmente os machos como o fazem seus compostos presentes nas glândulas abdominais (Capítulo 1). Também não

sabemos se as operárias que estão fundando ninhos respondem a compostos emitidos por suas potenciais rainhas.

Desse modo, o presente estudo testou a hipótese de que compostos químicos presentes em glândulas cefálicas de rainhas tenham significado para operárias fundadoras e machos. O objetivo do trabalho foi, então, analisar o perfil químico de extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Meliponini) e testar a atração a curtas distâncias por operárias fundadoras fora dos ninhos e machos durante agregações reprodutivas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Insetos

As rainhas virgens de *Tetragonisca angustula* foram criadas *in vitro* (modificado de MENEZES 2010 e PRATO, 2010, não publicado) transferindo-se larvas de 1-3 dias em placas de Elisa com 50 µL de alimento larval da espécie e mantidas em incubadora a 30°C em escuro constante com a umidade relativa controlada a 100% durante os três primeiros dias, 90-80% com KCl ou sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) por 10-11 dias e 70% com NaCl até a emergência dos adultos. Os favos que doaram alimento larval e as larvas foram coletados de colméias que enxamearam em ninhos-armadilha no *campus* da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP).

As rainhas virgens que emergiam foram colocadas aos pares dentro de placas de Petri contendo um favo com cria prestes a emergir, mel e pólen da própria espécie *ad libitum* e cerca de 20-30 operárias jovens não pigmentadas. À medida que as rainhas virgens atingiam a idade de 12-14 dias de emergidas suas relações com as operárias se intensificavam com recorrente solicitação de trofaláxis e corridas dentro dos recipientes.

Nesse momento, uma das duas rainhas nas placas iniciava agressões e perseguições contra a oponente mais freqüentemente sendo, denominadas aqui de fêmeas dominantes. O início das agressões, a intensa agitação, vibração das asas constante e a pigmentação (esclerotinização) da cutícula foram utilizadas como indicativos de maturidade sexual e, portanto, estas fêmeas dominantes foram utilizadas para análise química e bioensaios. As rainhas fisogástricas foram obtidas de colônias que haviam se estabelecido em ninhos-armadilha na Universidade São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto. A idade das rainhas fisogástricas não era conhecida, mas a presença de células de cria sendo construídas, sua fisogastria e o desgaste alar foram utilizados como indicativos de rainhas ativas, fecundadas e ovipositoras.

2.2. Extratos cefálicos das rainhas de *Tetragonisca angustula*

Após banho com hexano, os extratos das cabeças e abdômes de rainhas (N=1 triplicata) foram preparados macerando separadamente as cabeças com 30 µL de acetato de etila bidestilado e o extrato analisados por CG-EM. A identificação e quantificação dos compostos foram feitas pela pesquisadora Diana Araújo (colaboradora), sob a supervisão da Dra. Anita Jocelyne Marsaioli do Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

2.3. Bioensaios

Foram utilizadas cabeças de três rainhas virgens e três de rainhas fisogástricas maceradas individualmente e apresentadas imediatamente a 5-10 cm da entrada de dois ninhos em processo de fundação e um ativo, durante 3 min. Os três ninhos possuíam várias operárias fundadoras, assim como, dezenas de machos agregados sobre ou

próximos à entrada dessas colônias. Os testes ocorreram entre as 13:00-15:00 horas e, em cada um dos ninhos, aqui mencionados, foi apresentado inicialmente um dos extratos cefálicos de rainha virgem e, após 15 minutos, um dos extratos cefálicos de rainha fisogástrica.

Considerando que o *status* de rainha virgem é anterior ao de rainha fisogástrica e devido ao pequeno tamanho amostral, esses tratamentos foram analisados pelo teste não-paramétrico de Cochran ($p\text{-value} < 0.05$) que considera como premissa a quantidade de sucessos antes e depois de determinado tratamento. Assim, os casos de sucesso considerados como a atração de pelo menos um indivíduo (macho e/ ou operária) aos extratos cefálicos (tratamentos) de rainhas virgens (antes) ou fisogástricas (depois). O teste foi realizado no programa estatístico *Statistica*, versão 7.

3. Resultados

3.1. Perfil químico dos extratos cefálicos

O perfil químico dos extratos cefálicos das rainhas fisogástricas apresentou cerca de 23 compostos e mostrou-se muito mais variado que aquele das rainhas virgens (Tabela 1). A riqueza de compostos químicos encontrada nas cabeças de rainhas fisogástricas correspondeu principalmente a esteróides, alcenos e metil-alcenos, embora alguns ácidos tenham sido mais abundantes quando analisados conjuntamente. Destes ácidos, o ácido octadec-9-enóico + octadecadienóico foi majoritário, >30% nas cabeças das rainhas fisogástricas. Por outro lado, os extratos cefálicos das rainhas virgens foram constituídos praticamente por um único composto (>90%), o álcool nerol. Não foram encontrados alcoóis nos extratos cefálicos das rainhas fisogástricas.

Na Figura 1, é possível visualizar a riqueza de classes químicas e respectivas abundâncias relativas encontradas nas rainhas fisogástricas e a exclusividade do álcool

nerol nas rainhas virgens. Não houve sobreposição de compostos entre as rainhas virgens e as fisogástricas (Tabela 1).

Figura 2. Quantidade de classes de compostos químicos e abundância relativa presentes nos extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).

3.2. Teste de campo com os extratos cefálicos

A reação das operárias guardas ou fundadoras em ambos os tipos de ninhos, ou seja, ativo com substituição de rainhas ou em fundação, respectivamente, foi essencialmente de ignorar os extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas continuando a desenvolver suas atividades normalmente (Tabela 2). Somente duas guardas sobrevoaram os extratos de rainhas virgens e três operárias os extratos de

rainhas fisogástricas no ninho com substituição de rainhas. Porém, elas investigaram brevemente esses tratamentos, não aparentando maior interesse a eles (Tabela 2).

A resposta dos machos não foi muito diferente daquela apresentada pelas operárias. Nenhum macho, dos 153 presentes conjuntamente estimados nas três agregações (Tabela 2), se interessou por qualquer dos dois tratamentos com extratos cefálicos de ambas as rainhas. Alguns, inclusive, pousavam perto ou sobre os recipientes com os extratos. Porém, estes comportamentos não foram considerados como atração ou interesse aos tratamentos porque eles pousavam de modo característico de espera, ou seja, imóveis com as antenas em forma de “v” e, rapidamente, alçavam vôo deslocando-se para outras regiões da agregação. Não houve diferença significativa aos tratamentos de atratividade de operárias e machos aos extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas ($Q=3.000$; $df=3$; $p<0.3916$).

Tabela 2. Bioensaios com extratos cefálicos de rainhas virgens (VQ) e rainhas fisogástricas (PQ) de *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) apresentados a machos e operárias fundadoras ao lado de ninhos em processo de fundação ou substituição.

Ninhos		atraídas		Machos	Atraídos	
		operárias	VQ	PQ	VQ	PQ
Fundação ¹	17*	0	0	28	0	0
Fundação ²	21*	0	0	86	0	0
Substituição de rainhas ³	13**	2	3	39	0	0

1: ninho-armadilha *cha33*; 2: ninho racional *meliponário (mel.)*; 3: ninho-natural *chnr 16*.

* operárias fundadoras.

** operárias guardas.

Figura 1. Quantidade de operárias e machos presentes nas fundações de ninhos ou substituição de rainhas no momento dos testes com extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).

4. Discussão

4.1. Composição química dos extratos cefálicos das rainhas

Nossos dados demonstram uma clara diferença na composição química nos extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas de *T. angustula* sendo mais ricos nestas últimas e correspondentes ao maior desenvolvimento fisiológico e morfológico destas rainhas fecundadas e ovipositoras. Estudos semelhantes realizados com rainhas de ambos os *status* reprodutivos e com as mesmas porções corporais (cabeças) estão de acordo com nossos resultados. Assim, rainhas fisogástricas de outras espécies de abelhas sem ferrão, como *Scaptotrigona* spp. (ENGELS ET AL., 1993; ENGELS ET AL., 1997; GRAJALES-CONESA ET AL., 2007; VERDURGO-DARDON ET AL., 2011), ou mesmo em *A. mellifera* (APSEGAITE & SKIRKEVICIUS, 1995; ENGELS ET AL., 1997), tendem a ter um

aumento na complexidade química de suas glândulas cefálicas, possivelmente, para mediar atividades mais complexas dentro do ninho.

Essa maior quantidade de compostos nos extratos cefálicos de rainhas fisogástricas em relação às rainhas virgens está relacionada ao maior desenvolvimento das diversas glândulas exócrinas que aumentam em atividade após as mesmas estarem acasaladas (CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 1990; CRUZ-LANDIM *ET AL.*, 2005). Nossos resultados também demonstraram que ácidos carboxílicos são um dos principais componentes de seus extratos cefálicos, o que vem de acordo com dados encontrados para rainhas fisogástricas de outras espécies de abelhas altamente sociais (ENGELS *ET AL.*, 1993; APSEGAITE & SKIRKEVICIUS, 1995; ENGELS *ET AL.*, 1997).

As rainhas virgens, por outro lado, diferem drasticamente na composição química em relação às fisogástricas. Não houve compostos comuns entre uma e outra. A baixa presença de substâncias químicas nos extratos cefálicos das rainhas virgens, composta exclusivamente por nerol, está de acordo com a baixa complexidade de suas atividades, se alguma, que elas executam dentro do ninho durante este estágio de seu ciclo de vida. As rainhas virgens após atingirem a atividade passam boa parte do tempo solicitando trofaláxis às operárias, vibrando as asas e inflando o abdome. Após isso, muitas vezes, essas rainhas virgens são vistas se refugiando em câmaras de aprisionamento ou outros compartimentos dentro dos ninhos (NAVES DA SILVA *ET AL.*, 1972; IMPERATRIZ-FONSECA & ZUCCHI, 1995; NOGUEIRA-FERREIRA *ET AL.*, 2009).

4.2. Nerol nos extratos cefálicos de rainhas virgens de *Tetragonisca angustula*

Dentro de todos os compostos identificados nas cabeças das rainhas virgens e fisogástricas, o nerol, presente exclusivamente nas virgens, desperta interesse para saber seu possível significado biológico. Estudos conduzidos com outras espécies de abelhas

sem ferrão têm encontrado nerol em extratos cefálicos de operárias, onde esse composto possui papel de feromônio de alarme. Por exemplo, operárias de *Scaptotrigona mexicana* e *S. pectoralis* possuem comportamento de defesa quando extratos cefálicos de operárias coespecíficas contendo nerol são apresentados na frente de seus ninhos (WEAVER ET AL., 1975).

De modo semelhante, operárias de *Trigona fulviventrís* e *Melipona interrupta triparidis* abandonam o ninho rapidamente e reagem de modo defensivo quando extratos cefálicos contendo nerol de outras operárias são apresentados na frente da colônia (JOHNSON & WIEMER, 1982; SMITH & ROUBIK, 1983), respectivamente. Adicionalmente, operárias de *Geotrigona mobuca*, outra espécie de abelha sem ferrão, também possuem nerol em seus extratos cefálicos, porém não se conhece o significado biológico para esta espécie (FRANCKE ET AL., 2000).

4.3. Bioensaios com extratos cefálicos

O possível papel dos constituintes químicos encontrados nos extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas de *T. angustula* foi testado fora dos ninhos com especial interesse no nerol que, em outras espécies de abelhas sem ferrão, parece sinalizar alarme para as operárias (WEAVER ET AL., 1975; JOHNSON & WIEMER, 1982; SMITH & ROUBIK, 1983). A presença majoritária de nerol na cabeça das rainhas virgens de *T. angustula*, estando elas em um período pré-reprodutivo e sexualmente atrativas, sugeriria que seus extratos teriam algum papel atrativo, pelo menos, para os machos agregados pertos das colônias. Porém, nossa suspeita não se confirmou.

A não atração dos machos de *T. angustula* a compostos cefálicos de suas rainhas virgens tem sido registrada de modo diferente em outras espécies de abelhas sem ferrão, como as do gênero *Scaptotrigona* (ENGELS, 1987; ENGELS ET AL., 1993; ENGELS ET AL.,

1997; FLACH *ET AL.*, 2006; VERDUGO-DARDON *ET AL.*, 2011). Adicionalmente, em *A. mellifera* (GARY, 1962; BUTLER & FAIREY, 1964; PAIN & RUTTNER, 1963) e *B. terrestris* (KRIEGER *ET AL.*, 2006), os extratos cefálicos das rainhas virgens contém boa quantidade de álcoois com reconhecida atuação feromonal na atração dos machos.

Por fim, como o contexto social parece ser muito importante para os insetos sociais no momento em que eles emitem compostos químicos (BLUM *ET AL.*, 1972; BLUM, 1974), é possível que os compostos presentes nos extratos cefálicos das rainhas virgens e fisogástricas tenham sido reconhecidos mas não desencadeado alguma resposta específica de machos e operárias fora dos ninhos. No caso das guardas, por exemplo, elas apresentam uma resposta quase imediata a odores voláteis e não-voláteis de outras companheiras e outras espécies de abelhas sem ferrão que elas entram em contato (KÄRCHER & RATNIEKS, 2009).

Em suma, demonstramos que rainhas virgens e fisogástricas de *T. angustula* apresentam extratos cefálicos com perfis químicos marcadamente diferentes, correspondentes ao grau de complexidade das interações assumidas dentro do ninho. Adicionalmente, a função do nerol encontrado exclusivamente nos extratos das rainhas virgens necessita ser esclarecida, a fim de se determinar seu real significado para operárias e/ ou machos.

Tabela 1. Composição química dos extratos cefálicos de rainhas fisogástricas e virgens de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Colaboração com a pesquisadora Diana Araújo, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

No.	Compostos	IR (calc.)	IR (lit.)	Cabeças de rainhas (%) ^a	
				virgem	fisogástrica
1	Tricosano ^d	2300	2300	-	5,59±0,67
2	Pentacosano ^d	2500	2500	-	2,39±0,41
3	Heptacosano ^d	2700	2700	-	1,94±0,24
4	Nonacosano ^d	2900	2900	-	-
Metil-alcanos					
5	9-, e 11-metil-tricosano ^c	2338	-	-	2,46±0,69
6	9-, 11-, e 13-metil-pentacosano ^c	2536	-	-	2,56±0,72
7	9-, 11-, e 13-metil-heptacosano ^c	2735	-	-	1,79±0,44
8	9-, 11-, 13-, e 15-metil-nonacosano ^c	2935	-	-	1,72±0,28
9	11-, 13-, e 15-metil-hentriacontano ^c	3133	-	-	2,55±0,99
Alcenos					
10	9-, 10-, 11- e 12-Pentacoseno ^c	2471	-	-	0,92±0,15
11	9-, 10-, 11-, 12- e 13-Heptacoseno ^c	2671	-	-	0,42±0,11
12	10-, 11-, 12-, 13- 14-Nonacoseno ^c	2876	-	-	2,24±0,39
13	Hentriacontadieno	3048	-	-	5,22±1,38
14	10-, 11-, 12-, 13- 14- e 15- Hentriaconteno ^c	3097	-	-	7,01±0,58
15	Tritriacontadieno	3286	-	-	5,86±0,18
Dimetil-alcanos					
16	9,13-dimetil-pentacosano	2564	-	-	0,56±0,72
Ácidos					
17	Hexadecanóico	1969	1984	-	0,23±0,11
18	Octadec-9-enóico + octadecadienoico ^c	2137	2161	-	31,06±8,92
19	Octadecanóico	2149	2124	-	4,64±1,24
Álcool					
20	Nerol ^d	1266	1255	92,45±5,68	-
Cetonas					
21	2-nonadecanona	2104	2106	-	1,09±0,70
Esteróides					
22	Ergostadien-3β-ol	3282	-	-	2,55±0,11
23	Campesterol	3290	3305	-	4,37±3,78
24	β-Sitosterol	3419	3408	-	5,64±2,24
25	Fucosterol	3447	-	-	7,10±1,60
Compostos desconhecidos		-	-	7,45	0,09
Total		-	-	100	100

IR (calc.) = índice de retenção calculado; IR (lit.) = índice de retenção da literatura (<http://www.pherobase.com/>)^{a,b}
Média (abundâncias relativas em %) ± DP de rainhas de *Tetragonisca angustula* de duas colônias (a) e três colônias (b). ^c Compostos co-eluídos em um único pico. ^d Padrões sintéticos foram usados para confirmação destas estruturas. * Identificação e quantificação dos compostos feitas pela pesquisadora Diana Araújo (colaboradora) do Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

CAPÍTULO 3

PERFIL QUÍMICO DE MACHOS DE *TETRAGONISCA ANGUSTULA* (MELIPONINI) DENTRO E FORA DOS NINHOS E ALGUNS COMPORTAMENTOS INTRANIDAIIS

Abstract

The males of stingless bees perform few tasks of interest to the colony within their nests. These individuals may spend most of the time dehydrating nectar when they are next to abandon their nests. When the males leave their nests they go through this new phase of life outside the nest in search of reproductive females. When they find nests with virgin queens or nests being founded by the workers they aggregated in its vicinity for reproductive purposes. Little is known about the possibility of males in stingless bees release chemicals before or after leaving their nests, even if the chemical profiles change according to the life cycle of these individuals within and outside their nest of origin. Thus, this study aimed to analyze the chemical profile of cephalic extracts of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) males before and after leaving their nests. The objective was to further examine extracts of cuticular waxes and abdomen only using males outside the nest, i.e., collected in aggregations. Because the artificial conditions created to analyze the males inside the nest, some behaviors and interactions with workers were focused also on descriptions also. Colonies of *T. angustula* were orphaned to stimulate laying of eggs' workers that give rise to males. A settlement between the hive and the external environment was engaged and will be called the arena. In this arena the males of *T. angustula* spend much time. Nevertheless, males outside the nests were collected in aggregation. Chemical analyzes were made on gas chromatography coupled with mass spectrometer. Our results demonstrate that males after entering the arena spend several days within that container dehydrating nectar. Workers *T. angustula* are seen attacking these individuals, and after 8 days, in average, these males leave their nests. The cephalic extracts of males kept inside the nest are similar to those on aggregations both of them with large amount of carboxylic acids. Among these acids, the males of *T. angustula* share octadecadienoic + octadecenoic acids with the physogastric queens. The cuticle is represented essentially of linear hydrocarbon chains.

Key-words: cephalic extracts, males, stingless bee, dehydrating nectar, aggression

Resumo

Os machos das abelhas sem ferrão executam poucas tarefas de interesse para a colônia dentro de seus ninhos. Esses indivíduos podem passar a maior a maior parte do tempo desidratando néctar quando estão próximos de abandonar seus ninhos. Quando deixam seus ninhos os machos não voltam mais passando essa nova fase da vida fora do ninho em busca de fêmeas reprodutivas. Quando eles encontram, então, ninhos com rainhas virgens ou ninhos sendo fundados pelas operárias eles se agregam nas suas proximidades para fins reprodutivos. Pouco se conhece sobre a possibilidade de os machos em abelhas sem ferrão liberarem compostos químicos antes ou depois de deixarem seus ninhos, nem mesmo se os perfis químicos se alteram dependendo do ciclo de vida desses indivíduos dentro e fora dos ninhos de origem. Desse modo, o presente estudo objetivou analisar o perfil químico de extratos cefálicos de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) antes e depois de abandonarem seus ninhos. Objetivou-se ainda analisar extratos de ceras cuticulares e abdome somente de machos fora dos ninhos, ou seja, coletados em agregações reprodutivas. Devido às condições artificiais criadas para analisar os machos dentro do ninho, alguns comportamentos e interações com operárias foram foco de descrição também. Colônias de *T. angustula* foram deixadas órfãs para estimular a postura de ovos pelas operárias que darão origem a machos. Um compartimento entre a colméia e o ambiente externo foi acoplado e será chamado de arena. Nesta arena os machos de *T. angustula* passam boa parte do tempo. Os machos de fora dos ninhos foram coletados em agregações reprodutivas. As análises químicas foram feitas em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Nossos resultados demonstram que os machos depois que entram na arena passam vários dias dentro desse recipiente desidratando néctar. Operárias de *T. angustula* são vistas agredindo esses indivíduos. Cerca de 8 dias depois os machos abandonam seus ninhos. Os extratos cefálicos dos machos que vivem dentro do ninho são semelhantes aos dos machos das agregações ambos possuindo grande quantidade de ácidos carboxílicos. Desses ácidos, os machos de *T. angustula* compartilham os ácidos octadecenóico + octadecadienóico com as rainhas fisogástricas. Alguns outros compostos diminuem e outros aparecem, mas em menor porcentagem relativa naqueles machos visitando agregações reprodutivas. A cutícula é representada essencialmente por hidrocarbonetos de cadeias lineares.

Palavras-chave: extratos cefálicos, machos, Meliponini, desidratação, agressão

1. Introdução

As abelhas são organismos haplodiplóides onde os ovos fecundados dão origem a fêmeas e os ovos não fecundados, haplóides, dão origem a machos (COOK & CORZIER, 1995; HEIMPEL & BOER, 2008). Por conta desse sistema, há uma assimetria genética entre os membros da colônia (TRIVERS & HARE, 1976), que pode levar as operárias em abelhas sem ferrão a terem um conflito reprodutivo com suas rainhas pela postura de ovos que darão origem a machos (TÓTH *ET AL.*, 2002).

O caso de colônias de *Tetragonisca angustula* ilustra bem esse cenário. Em colônias dessa espécie com a presença de rainha fisogástrica e ovipositora, as operárias somente ovipositam nas células de cria ovos tróficos que alimentam suas rainhas, mesmo possuindo ovos reprodutivos em seus ovários (KOEDAM *ET AL.*, 1996). Porém, quando as colônias estão órfãs, ou seja, sem rainha ovipositora, pode haver uma grande produção de machos provenientes de ovos colocados pelas operárias (GROSSO *ET AL.*, 2000).

A despeito de quem são suas potenciais mães, entretanto, é sabido que os machos de abelhas sem ferrão, de um modo geral, desempenham poucas atividades de interesse para a rotina de suas colônias. Quando adultos, eles podem ficar boa parte do tempo desidratando néctar recebido de outras operárias ou irmãos (IMPERATRIZ-FONSECA, 1973; CORTOPASSI-LAURINO, 1979; 2007). Mas, após eles atingirem a maturidade sexual, eles abandonam seus ninhos permanentemente (CORTOPASSI-LAURINO, 1979; SAKAGAMI, 1982; ENGELS & ENGELS, 1984). Após isso, eles formam numerosas agregações perto de ninhos coespecíficos para fins reprodutivos (NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000).

O abandono do ninho parece ser algumas vezes estimulado pelas operárias que podem agredir alguns machos quando eles já estão maduros sexualmente (IMPERATRIZ-

FONSECA, 1973, 1977; CORTOPASSI-LAURINO, 1979; SAKAGAMI, 1982). Após deixarem os ninhos eles não entram mais, mesmo quando muitos deles estão agregados nas proximidades da entrada das colônias (ROUBIK, 1990; VAN VEEN *ET AL.*, 1997; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000).

Será que existe algum tipo de reconhecimento químico entre machos e operárias? Será que compostos presentes nos machos podem ser pistas químicas para suas operárias? Considerando que a comunicação química em insetos sociais possui um papel preponderante (WILSON, 1965; BILLEN, 2006), é possível que tal interação seja, sim, mediada por semioquímicos. Compostos voláteis e não-voláteis (*e.g.* hidrocarbonetos cuticulares) podem funcionar como pistas químicas ou feromônios nos insetos (SINGER, 1998; AYASSE *ET AL.*, 2001). Um trabalho feito com machos e operárias de *Scaptotrigona mexicana* revela que os machos podem ser guiados mais por odores de outros machos do que os de suas operárias (LÓPEZ & KRAUS, 2009). Portanto, analisar o perfil químico dos indivíduos é o primeiro passo que motiva avançar para responder às perguntas acima.

Em outras espécies de abelhas sem ferrão tem-se encontrado que indivíduos de castas e sexos diferentes de uma mesma espécie podem ter perfis químicos diferentes uns dos outros dependendo da idade ou da atividade desenvolvida dentro e fora do ninho (ABDALLA *ET AL.*, 2003; NUNES *ET AL.*, 2008; 2009; PIANARO *ET AL.*, 2009; FERREIRA-CALIMAN *ET AL.*, 2010). Este fato sugere um potencial reconhecimento ou discriminação química por parte dos outros membros da colônia (ABDALLA *ET AL.*, 2003; NUNES *ET AL.*, 2008; 2009; PIANARO *ET AL.*, 2009; FERREIRA-CALIMAN *ET AL.*, 2010).

A mudança temporal no perfil químico dos indivíduos que compõem um ninho pode ser muito informativa para identificar castas e sexos. Na abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia*, por exemplo, machos jovens diferem quimicamente nos seus

perfis de hidrocarbonetos daqueles indivíduos mais velhos dentro do ninho (NUNES *ET AL.*, 2009). Em mamangavas *Bombus terrestris* e *Bombus lucorum*, a composição química das glândulas labiais dos machos dentro e fora dos ninhos também muda à medida que os indivíduos envelhecem e adquirem maturidade sexual (ZACEK *ET AL.*, 2009), de maneira que a atratividade dos machos para as rainhas virgens varia com sua idade (COPPÉE *ET AL.*, 2011).

Pelo exposto, verifica-se que os machos em abelhas sem ferrão possuem duas fases distintas de seu ciclo de vida, uma dentro do ninho e outra fora, no ambiente externo. Há ainda poucas informações sobre o comportamento dos machos dentro dos ninhos (IMPERATRIZ-FONSECA, 1973, 1977; CORTOPASSI-LAURINO, 1979; SAKAGAMI, 1982) e pouco se conhece sobre as possíveis mudanças no perfil químico desses indivíduos (NUNES *ET AL.*, 2009). Desse modo, o objetivo do presente estudo foi analisar o perfil químico de machos de *Tetragonisca angustula* que ainda não abandonaram seus ninhos de origem, comparando-o com machos que visitam agregações reprodutivas. Nossa hipótese é que deve haver diferença química entre machos de *Tetragonisca angustula* dentro e fora dos ninhos.

Essa análise se baseou principalmente em extratos cefálicos de machos nas duas condições. Adicionalmente, a composição química do abdome e da cera cuticular dos machos coletados em agregações foi analisada. Por fim, algumas descrições comportamentais dos machos dentro dos ninhos foram oportunamente feitas à medida que eram criadas condições artificiais para o aparecimento massal desses indivíduos dentro das colônias.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos machos dentro dos ninhos

Três colônias de *T. angustula* do Laboratório de Abelhas da Universidade de São Paulo/ São Paulo foram deixadas órfãs em abril de 2010 e janeiro de 2011 com a remoção das respectivas rainhas fisogástricas. Essa condição interna do ninho estimula as operárias de *T. angustula* a ovipositarem ovos reprodutivos (haplóides), que darão origem a machos. Adicionalmente, foi verificado se não havia nenhuma célula real que pudesse conter rainhas virgens.

A fim de visualizar a presença de machos no interior do ninho foi acoplado um compartimento entre a colônia e o tubo de plástico de saída que liga a colônia ao exterior. Esse compartimento, chamado a partir de agora de *arena*, era constituído por uma caixa entomológica tampada com um vidro transparente para monitorar periodicamente as atividades internas dos insetos. Quando não era filmada, esta arena permaneceu coberta com um pano de feltro preto para impedir que as operárias forrageiras e lixeiras que passavam por ali se confundissem e tentassem alçar vôo dentro da arena. Uma lâmpada incandescente de 40W foi colocada ao lado da arena a fim de criar uma fonte de calor. Esta fonte de calor é atrativa para os machos quando eles já adentram a arena, tendendo a permanecerem preferencialmente nessa região desidratando néctar ou durante o repouso noturno.

Os machos começam a aparecer na arena perto de completar dois meses após a condição de orfandade ter sido criada. Quando eles se deslocam para a arena eles não a deixam mais até abandonarem o ninho permanentemente. Enquanto eles estiveram na arena foi oferecido alimento em algodão embebido com xarope de água com açúcar.

2.2. Obtenção dos machos fora dos ninhos (agregações reprodutivas)

Os machos coletados nos aglomerados foram tomados de três agregações em ninhos em processo de fundação na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Dois ninhos estavam sendo fundados nos ninhos-armadilha NA19 e NA23 e o outro (NADani) na parede de uma sala no prédio da Entomologia da mesma instituição, em fevereiro de 2011.

2.3. Extratos de cefálicos e abdominais e análise no CG/MS

De cada um dos três ninhos órfãos foram coletados seis indivíduos e agrupados em uma única amostra representante de machos dentro do ninho, portanto, 18 indivíduos compondo este grupo. Para este grupo, somente os extratos cefálicos foram analisados quimicamente. Simultaneamente, seis indivíduos de cada uma das três agregações reprodutivas foram coletados para as análises químicas. Deste grupo, foram feitas análises químicas dos extratos cefálicos para comparar com as dos machos de dentro dos ninhos, além de análises do abdome e da cutícula.

2.2. Análise dos dados

As análises químicas foram desenvolvidas no Instituto de química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em colaboração com a pesquisadora Francisco Diana da Silva Araújo supervisionada pela Dra. Anita Jocelyne Marsaioli do Instituto de Química.

Foi realizado um teste não-paramétrico de Wilcoxon pareado para testar a hipótese de que há diferença nos componentes químicos dos extratos cefálicos dos machos dentro e fora dos ninhos. O teste foi feito no programa estatístico *Statistica 7*.

3. Resultados

3.1. Quantidade de machos emergidos em colônias órfãs e alguns comportamentos típicos nas arenas

O número total de machos registrados conjuntamente dentro das 3 arenas foi de 216 machos distribuídos em 32 (colônia 1), 128 (colônia 2) e 56 (colônia 3) indivíduos (Figura 1). Os machos da colônia 1 permaneceram na arena por oito dias, após isso não foram mais vistos. Os machos da colônia 2 deixaram seus ninhos após ficarem 11 dias na arena e, por fim, os machos da colônia 3 abandonaram suas colônias após seis dias de permanência na arena. Em média, portanto, eles passaram 8.33 dias dentro das arenas antes de abandoná-las definitivamente.

Figura 1. Número de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) registrados em três colônias órfãs. Laboratório de Abelhas da Universidade de São Paulo/ São Paulo

Os machos parecem se deslocar do interior do ninho para a arena quase todos no mesmo dia, mas alguns podem se unir ao grupo alguns dias depois (Figura 2A - 2C). Eles já chegam totalmente pigmentados na arena e ali permanecem por vários dias sem abandoná-la. No período noturno os machos não desenvolvem nenhuma atividade e tendem a ficar agrupados na porção mais quente da arena, onde fica a fonte artificial de calor externa.

Figura 2. Registro por filmagem de um ninho órfão com presença de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). A – visão geral; B – arena (= caixa entomológica) com machos a alguns dias antes de abandonar permanentemente o ninho. Neste arena, os machos permaneciam durante todo o dia, inclusive de noite desidratando néctar; C – detalhe da arena mostrando alguns indivíduos agrupados à direita.

Durante o dia, porém, a movimentação é maior e os machos ali presentes recebem e desidratam o néctar trazido por campeiras ou de outros machos que tenham por seu turno recebido este alimento de outro indivíduo. Ocasionalmente, alguns machos deixam temporariamente o pequeno agregado e percorrem de modo agitado toda a extensão da arena solicitando trofaláxis ao primeiro indivíduo que encontra, seja de operárias recém chegadas do forrageio ou de outro macho. O macho que solicita a

doação de néctar de outro macho quase sempre a recebe do companheiro, após isso, ambos os machos limpam suas antenas passando o estrigilo das pernas anteriores ao longo delas.

Os machos permanecem o dia inteiro desidratando o néctar recebido dos outros indivíduos. Além de se alimentarem dos conteúdos líquidos solicitados às operárias ou aos outros machos, esses indivíduos se dirigem rapidamente para o algodão embebido com xarope de água com açúcar. Em um primeiro momento, quando eles estendem a glossa para coletar o xarope, eles hesitam e limpam suas antenas, mas passado um breve momento, já é possível verificar quase todos se alimentando no xarope. Ao longo do dia, poucos continuam se dirigindo ao algodão com xarope para se alimentarem. Ainda dentro da arena, ocasionalmente é observada uma operária mordendo um macho pelas pernas e antenas de modo intenso sem que este tente fugir ou revidar a agressão. Quando liberados pelas operárias, eles permanecem poucos segundos se limpando e voltam para o agrupamento de machos no interior da arena.

3.2. Composição química dos extratos cefálicos dos machos

De um modo geral, foram identificados 26 compostos nos extratos cefálicos dos machos de *T. angustula* dentro e fora dos ninhos. Os compostos majoritários encontrados nessa porção corporal foram 10 ácidos carboxílicos, > 50% (Figura 3), sendo os ácidos octadecenóico+octadecadienóico os principais constituintes dos extratos cefálicos de ambos os machos (Tabela 1). Os extratos cefálicos dos machos dentro dos ninhos também foram bem representados pelos ácidos tetradecanóico (> 8%) e hexadecanóico (> 6%), assim como, o esteróide ergostadien-3 β -ol (4%). Por outro lado, o hidrocarboneto pentacosano, pouco representado nos machos dentro dos ninhos (< 2%), foi o segundo principal componente nos extratos cefálicos dos machos fora dos

ninhos (15%), seguido de dois esteróides, campesterol (> 6%) e β -sitosterol (> 6%). Houve traços de nerol e geraniol em ambos os tipos de machos analisados (dentro e fora dos ninhos). O nerol, como visto no Capítulo 2, está presente exclusivamente nos extratos cefálicos de rainhas virgens nessa espécie, porém, sem função biológica conhecida.

Figura 3. Classes de compostos químicos presentes nos extratos cefálicos de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) coletados dentro de ninhos e em agregações reprodutivas. Colaboração da pesquisadora Diana Araújo, Instituto de Química Laboratório de Universidade Estadual de Campinas.

Os machos dentro e fora dos ninhos compartilham em seus extratos cefálicos 80.7% dos compostos uns com os outros. A exceção se encontra na presença dos ácidos

decanóico e heptadecanóico, do nonacosano, do pentacosano e do éster octadecenoato de octadecila exclusivos dos machos fora dos ninhos (agregações reprodutivas). Apesar, porém, das diferenças de abundância relativa de alguns compostos e da ausência de alguns constituintes, não há diferença significativa entre os extratos cefálicos dos machos antes de abandonarem os ninhos e depois quando estão nas agregações (Wilcoxon; $p = 0.161$).

3.3. Análise química do abdome e da cutícula de machos em agregações reprodutivas

A cutícula dos machos que visitam as agregações reprodutivas foi composta essencialmente por hidrocarbonetos de cadeia linear, no caso, alcanos: pentacosano (48.89% ± 3.78), heptacosano (38.90% ± 2.49), nonacosano (7.81% ± 1.09) e hentriacontano (4.39% ± 0.19) – Figura 4; Tabela 1. O pentacosano e o heptacosano estavam presentes no abdome e extratos cefálicos dos machos fora dos ninhos. Em contrapartida, os abdômes dos machos fora dos ninhos compartilham alguns ácidos carboxílicos (70%, especialmente octadecenóico+octadecadienóico > 51%), alcanos (> 15%), ésteres (> 2%) e esteróides (> 5%) encontrados nas cabeças dos machos. Porém, o abdome não contém aldeídos presentes nas cabeças dos machos, mesmo que essa classe de compostos tenha sido relativamente pequena nas cabeças, < 5%.

Figura 4. Composição química evidenciando as porcentagens encontradas nas cabeças, abdômes e cutículas de machos de *Tetragnisca angustula* (Hymenoptera; Apoidea: Meliponini), coletados em agregações reprodutivas. Colaboração da pesquisadora Diana Araújo, Instituto de Química Laboratório de Universidade Estadual de Campinas.

4. Discussão

4.1. Comportamento dos machos antes de abandonar os ninhos

4.1.1. Desidratação de néctar

A principal atividade dos machos de *T. angustula* antes de deixarem permanentemente seus ninhos foi a desidratação de néctar recebido por trofalaxia de operárias voltando do campo ou de outros machos que tinham recebido dessas operárias. Muitas das operárias interceptadas pelos machos não chegam a entrar no ninho e retornando imediatamente para fora uma nova viagem de forrageio. A

desidratação de néctar por machos de abelhas sem ferrão parece ser comum (CORTOPASSI-LAURINO, 1979, 2007; VAN VEEN *ET AL.*, 1997) e regiões do ninho mais aquecidas podem ser preferidas pelos machos para desidratar néctar (IMPERATRIZ-FONSECA, 1973), como registrado no presente estudo.

No início de vida dos machos, a desidratação de néctar pode ser uma atividade pouco expressiva (VAN VEEN *ET AL.*, 1997), mas parece que à medida que eles vão ficando mais velhos e restando poucos dias para abandonar seus ninhos, a desidratação de néctar torna-se a principal atividade dos machos (IMPERATRIZ-FONSECA, 1973; CORTOPASSI-LAURINO, 1979, 2007). Mesmo fora de seus ninhos, machos do gênero *Melipona*, que se agregam em sítio de congregação, são vistos desidratando néctar (SOMMEIJER *ET AL.*, 2003; CORTOPASSI-LAURINO, 2007).

A desidratação de néctar não parece ser exclusiva de Meliponini, entretanto. Esse comportamento já foi registrado para machos de mamangavas, *Bombus terrestris* e *Bombus lucorum* (Bombini), antes de deixarem permanentemente seus ninhos de origem (BERTSCH, 1984). Mesmo espécies onde os machos podem retornar para seus ninhos, como *Xylocopa nigrocincta*, os machos desidratam néctar recebido das companheiras do ninho (mães, irmãs) e deixam temporariamente o ninho para buscar fêmeas receptivas no ambiente (WITTMANN & SCHOLZ, 1989).

Em qualquer caso, porém, a explicação mais provável para essa desidratação de néctar pelos machos das mais variadas espécies de abelhas está relacionada à tomada de energia e diminuição do peso corporal para fins reprodutivos (BERTSCH, 1984; WITTMANN & SCHOLZ, 1989). A longa persistência nas agregações sobrevoando a entrada do ninho exige uma grande carga de energia. Deixar temporariamente as agregações pode não ser a melhor estratégia para um indivíduo que já possua poucas chances de se acasalar com as rainhas. Em *T. angustula*, os machos permanecem longos períodos de tempo

sobrevoando a entrada da colônia (MICHENER, 1946; observação pessoal). Assim, o néctar desidratado dentro do ninho pode ser fundamental para que esses indivíduos permaneçam longos períodos de tempo sem, aparentemente, deixar as agregações.

4.1.2. Agressão dos machos por operárias dentro dos ninhos

A agressão de machos de abelhas sem ferrão por operárias parece ser comum dentro dos ninhos (SCHWARZ 1948; IMPERATRIZ-FONSECA, 1973, 1977; CORTOPASSI-LAURINO, 1979; SAKAGAMI, 1982). Até mesmo machos de outras espécies de abelhas, como *Xylocopa frontalis* e *Xylocopa varians* (in WITTMANN & SCHOLZ, 1989), *Bombus californicus*, *B. rufocinctus*, dentre outras (in FOSTER, 1992) podem ser atacados e expulsos por companheiras de ninho. O ataque das operárias pode estar relacionado ao interesse sexual dos machos às suas rainhas, como em *Schwarziana quadripunctata* (IMPERATRIZ-FONSECA, 1973) e *Plebeia droryana* (CORTOPASSI-LAURINO, 1979), ou devido à grande densidade deles em um dado momento (CORTOPASSI-LAURINO, 1979). Como observado no presente estudo para *T. angustula*, houve a produção de dezenas de machos que superpovoaram suas arenas temporariamente e essas localidades não eram visitadas por rainhas, já que as colônias estavam órfãs.

Os machos de *T. angustula* agredidos pelas operárias não os atacaram, fato também observado para outras espécies, como *Paratrigona subnuda* (IMPERATRIZ-FONSECA, 1977) e *Plebeia droryana* (CORTOPASSI-LAURINO, 1979). É possível que este comportamento agressivo direcionado aos machos seja típico de algumas operárias (IMPERATRIZ-FONSECA, 1977; CORTOPASSI-LAURINO, 1979). Uma possível explicação evolutiva para o ataque dos machos em abelhas sem ferrão pode ser a longa permanência de machos sexualmente maduros dentro dos ninhos que representam, potencialmente, ameaças de acasalamentos endogâmicos com rainhas aparentadas

(NOGUEIRA-NETO, 1957; SAKAGAMI & LAROCA, 1963; IMPERATRIZ-FONSECA, 1973; CORTOPASSI-LAURINO, 1979).

4.1.3. Abandono dos ninhos pelos machos

Para os machos de abelhas sem ferrão, não é interessante permanecer muito tempo dentro dos ninhos após eles atingirem a maturidade sexual, porque a cada dia que eles passam dentro da colônia, menos tempo lhes resta para procurar por rainhas virgens diminuindo, assim, seu valor adaptativo (KERR, 1990). Assim, após alguns dias desidratando néctar e pernoitando nas areias, os machos de *T. angustula* não foram mais vistos nesses compartimentos.

O horário específico de abandono pelos machos de *T. angustula* não foi registrado, mas acreditamos que eles tenham abandonado seus ninhos no início da manhã, antes da 09h00. Isso porque as gravações e registros iniciavam-se diariamente a partir da 09h00 e nos dias que foi verificado ausência dos machos foi sempre no começo das gravações do dia seguinte. Um ou outro indivíduo ficava ainda no ninho, mas a maior parte parecia abandonar os ninhos em grupo. Para machos de *P. droryana* foi verificado também que os machos tendem a abandonar os ninhos no mesmo dia, embora alguns indivíduos demorem alguns dias para fazer isso (CORTOPASSI-LAURINO, 1979).

4.2. Compostos químicos dos machos

Os machos de *T. angustula* possuem muitos compostos comuns uns com os outros nas suas glândulas cefálicas e, mesmo não havendo diferença significativa na composição química de seus extratos, há alguns compostos que somente estão presentes nos machos que visitam agregações reprodutivas. Embora não possamos saber sobre a

natureza biológica desses compostos, a mudança no perfil químico de machos à medida que os mesmos vão envelhecendo está de acordo com estudos realizados com machos de outras espécies de abelhas sem ferrão (NUNES *ET AL.*, 2009) e mamangavas (ZACEK *ET AL.*, 2009; COPPÉE *ET AL.*, 2011).

No presente estudo pudemos demonstrar que os extratos cefálicos dos machos de *T. angustula* possuem uma riqueza e abundância grande de ácidos carboxílicos. Das análises feitas com extratos cefálicos de rainhas virgens e fisogástricas (Capítulo 2) verificou-se que somente as rainhas fisogástricas possuíam esses ácidos carboxílicos, três no total. Entre os ácidos carboxílicos encontrados nos extratos cefálicos das rainhas fisogástricas e dos machos, o octadec-9-enóico + octadecadienóico foi o mais abundante. Porém, o significado biológico desse composto não é conhecido. Em análises de extratos cefálicos de machos de outras espécies de abelha sem ferrão, a presença de vários tipos de ácidos carboxílicos, como aqui identificados (#10) não é muito comum. Por exemplo, extratos cefálicos de machos de *Nannotrigona testaceicornis* não apresentaram ácidos carboxílicos e os extratos cefálicos de machos de *Plebeia droryana* apresentaram somente dois ácidos (tetradecanóico e hexadecanóico), e mesmo assim, em baixa concentração, < 1.5% (PIANARO *ET AL.*, 2009).

A composição química das glândulas cefálicas dos machos de *T. angustula* pode ser utilizada como precursora de outros compostos ou pode sinalizar informações ainda desconhecidas. Já foi registrado que machos agregados de *Scaptotrigona postica*, quando sutilmente pressionados, parecem liberar feromônios de alarme fazendo com que todos os indivíduos pousados alçem vôo imediatamente (ENGELS & ENGELS, 1984). Eu fiz algumas tentativas, *a posteriori*, de exibir extratos corporais macerados aos machos de *T. angustula* e obtive o mesmo comportamento, ou seja, dispersão geral dos indivíduos pousados.

Com base nos compostos químicos aqui identificados para os machos de *T. angustula*, seria interessante que outras pesquisas tentassem descobrir se os machos de abelhas sem ferrão podem, de fato, demarcar e reconhecer os locais onde eles se agregam. Alguns estudos feitos com *S. postica* (KERR ET AL., 1962; ENGELS & ENGELS, 1984) sugerem essa possibilidade, embora não se saiba a natureza química desses potenciais compostos. Em um estudo utilizando olfatômetro com machos e operárias de *Scaptotrigona mexicana* foi encontrado que os machos dessa espécie preferencialmente se dirigiam para o tratamento com odores de outros machos e quase nada para suas operárias (LÓPEZ & KRAUS, 2009).

Outro exemplo de que os odores dos machos possam ter algum papel na comunicação química de outros machos é o caso dos machos de abelhas melíferas que se agregam em áreas abertas e aéreas. Os zangões de *A. mellifera* possuem compostos químicos nas glândulas mandibulares que atrativos para outros machos perto das congregações (LENSKY ET AL., 1985). Por outro lado, um estudo recentemente desenvolvido com machos de *N. testaceicornis* e *P. droryana* demonstrou que machos de *P. droryana* possuem (S)-2-nonanol em seus extratos cefálicos, que atraem as operárias de *P. droryana*, *N. testaceicornis* e *Frieseomelitta silvestrii*, mas não os machos da própria espécie, *P. droryana* (PIANARO ET AL., 2009).

Os alcanos de cadeia linear (C25, C27, C29 e C31) presentes nos machos coletados em agregações são comumente encontrados nas ceras cuticulares de castas e sexos de outras espécies de abelhas sem ferrão (ABDALLA ET AL., 2003; KERR ET AL., 2004; NUNES ET AL., 2009). Embora a comparação da composição química de machos e fêmeas no presente estudo não tenha sido alvo de investigação, foi possível constatar que o hidrocarboneto hentriacontano (C31) esteve presente somente na cutícula dos machos de *T. angustula*, mas não em suas rainhas virgens e fisogástricas (Capítulos 1 e 2). Em

machos *Melipona bicolor* (ABDALLA ET AL., 2003) e *Plebeia droryana* (PIANARO ET AL., 2009), o hentriacontano também foi um marcador químico de machos, mas não de fêmeas, operárias. Porém, para *Friseomelitta varia*, o hentriacontano esteve presente nas fêmeas de ambas as castas (NUNES ET AL., 2009).

O presente estudo demonstrou que poucos dias antes de deixar os ninhos, os machos de *T. angustula* passam a maior parte do tempo desidratando néctar. O alimento, assim, desidratado, certamente contribui para a aquisição e acúmulo de energia, mas possivelmente, pode ser precursor dos compostos encontrados nesses insetos quando nas agregações reprodutivas. Seus extratos cefálicos são bastante parecidos com aqueles de machos coletados em agregações reprodutivas, mas com algumas mudanças importantes, como o significativo aumento na quantidade de pentacosano em seus extratos cefálicos.

Pentacosano e heptacosano também estão bem representados nos abdômes dos machos coletados em agregações. Porém, os hidrocarbonetos de cadeia linear predominam na cutícula dos machos. Não sabemos ainda se os compostos aqui identificados mediam a interação química entre os machos ou entre eles e os membros de suas colônias ou suas parceiras sexuais. Analisar a função biológica desses compostos pode ajudar a esclarecer alguns comportamentos direcionados a eles pelas operárias, ou atividades realizadas por eles nas agregações ou para as rainhas virgens durante o vôo nupcial.

Tabela 1. Perfil químico de machos de *Tetragonisca angustula* (Meliponini) em diferentes ciclos de vida.

No.	Compostos	IR (calc.)	IR (lit.)	Extratos cefálicos		Abdomes (%) ^a	Lipídios cuticulares (%) ^a
				♂♂ interior do ninho	♂♂ agregação		
				♂♂ agregação			
Ácidos							
1	Ácido benzóico	1174	-	0,96±0,22	0,10±0,14	-	-
2	Ácido decanóico	-	-	-	0,04±0,05	-	-
3	Ácido dodecanóico	1582	1568	3,77±0,47	2,21±2,55	1,69±1,16	-
4	Ácido tetradecenóico	1763	-	0,36±0,10	0,39±0,55	-	-
5	Ácido tetradecanóico	1789	1720	8,74±0,78	4,62±4,89	3,11±1,41	-
6	Ácido hexadecenóico	1998	1938	1,46±0,14	0,67±0,94	-	-
7	Ácido hexadecanóico	2028	1984	6,83±0,43	3,16±3,91	2,64±0,46	-
8	Ácido heptadecanóico	-	-	-	0,03±0,04	-	-
9	Ácidos octadecenóico + octadecadienóico ^b	2238	2161	46,11±0,52	37,64±36, 16	51,52±25, 84	-
10	Ácido octadecanóico	2248	2200	8,27±2,28	5,30±6,68	14,69±2,4 8	-
Alcanos							
11	Pentacosano ^c	2500	2500	1,67±0,18	15,37±18, 62	10,29±11, 40	48,89±3,78
12	Heptacosano ^c	2700	2700	0,92±0,06	0,57±0,81	5,50±5,85	38,90±2,49
13	Nonacosano ^c	2900	2900	-	0,46±0,39	-	7,81±1,09
14	Hentriacontano ^c	3100	3100	-	-	-	4,39±0,19
Alcenos							
15	Pentacoseno	-	-	-	0,05±0,07	-	-
Alcoóis							
16	Nerol ^c	-	1228	Traços	Traços	-	-
17	Geraniol ^c	-	1255	Traços	Traços	-	-
Aldeídos							
18	Benzaldeído ^c	932	961	2,19±0,71	0,64±0,58	-	-
19	Benzenoacetaldeído	1027	1043	0,58±0,04	0,32±0,16	-	-
20	Neral	1251	1240	0,19±0,12	0,08±0,12	-	-
21	Geranial	1283	1270	0,36±0,18	0,14±0,20	-	-
Ésteres							
22	Butirato de tetradecila	1985	-	0,52±0,08	0,72±0,80	-	-
23	Acetato de hexadecila	2004	2009	-	-	0,65±0,92	-
24	Octadecenoato de etila	-	-	-	0,53±0,75	2,26±3,19	-
Esteróides							
25	Ergostadien-3β-ol	3282	-	4,08±0,98	1,66±2,35	-	-
26	Campesterol	3290	3305	3,05±0,11	6,91±9,77	-	-
27	β-Sitosterol	3419	3408	3,44±0,37	6,83±9,66	5,46±7,72	-
28	Fucosterol	3447	-	3,16±0,18	0,09±0,12	-	-
Compostos desconhecidos		-	-	3,33	11,46	2,19	-
Total		-	-	100	100	100	100

IR (calc.) = índice de retenção calculado; IR (lit.) = índice de retenção da literatura (<http://www.pherobase.com/>).

^aMédia (abundâncias relativas em %) ± DP de machos de *T. angustula* (N=6) de três colônias. ^bCompostos co-eluídos em um único pico. ^cPadrões sintéticos foram usados para confirmação destas estruturas. Colaboração com Diana Araújo e Dra. Anita Jocelyne Marsaioli. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas.

CAPÍTULO 4

DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE MACHOS DE *TETRAGONISCA ANGUSTULA* EM FUNDAÇÕES DE NINHO E POTENCIAL DE DISPERSÃO

Abstract

The mating system of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) is characterized by the presence of several males near the nests in the process of founding by the workers. Although *Tetragonisca angustula* is one of the best known stingless bee species, there are still gaps in knowledge concerning to the reproductive biology of males. (1) It is not known how many colonies contribute with males to the aggregations, (2) the relatedness among males that are aggregated and among them and the colony that produced the gynes to be fertilized, (3) how genetically similar are the aggregations kept simultaneously in the same area, (4) the potential for males dispersal from the original nest to the aggregations. This study aimed to analyze the above questions with males of *T. angustula*. Five aggregations were analyzed in Ribeirão Preto. They occurred in front of trap nests receiving new swarms. Several natural nests and hives found in the studied area were sampled and georeferenced. In all colonies found in the area workers and males were collected, genotyped with six microsatellite markers and their genotypes used to infer relatedness with males and thus rebuild their colonies (families) of origin, as these genotypes were used to reconstruct the potential maternal genotype. After this, the genetic structures of the five aggregations were investigated. The dispersal distance of males was obtained after identifying some of their natal colonies and estimated the distance to the aggregations through nests georeferencing. We estimated that 376 males collected in the five aggregations belonged to 83 colonies. There was an average of four males donated by each colony, but there were only 1:57 related males in aggregations. Only 3.45% of the males were related to queens. On average, males dispersed 612 meters considering the distance between their natal nest and the aggregation where they were sampled.

Key-words: aggregation, bees, males, genetic structure, nest dispersal, relatedness.

Resumo

O sistema de acasalamento de machos de abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Meliponini) se caracteriza pela presença de vários machos nas proximidades de ninhos em enxameagem. Embora a espécie *Tetragonisca angustula* seja uma das abelhas sem ferrão melhor conhecidas, há ainda lacunas em relação à biologia reprodutiva dos machos. (1) Não se conhece quantas colônias contribuem com machos nas agregações; (2) Não se conhece quantos machos são aparentados entre si nas agregações e se eles são aparentados com o ninho onde está a agregação; (3) como são geneticamente estruturadas as agregações que ocorrem simultaneamente em uma área ; (4) qual potencial de dispersão dos machos de seus ninhos de origem até as agregações. O presente estudo objetivou analisar as perguntas acima com machos de *T. angustula*. Cinco agregações foram analisadas no município de Ribeirão Preto. Essas agregações ocorriam na frente de ninhos-armadilha em processo de enxameagem. Operárias de vários ninhos naturais e colmeias da localidade foram amostradas e suas colônias georreferenciadas. As operárias e machos coletados foram genotipados com 6 loci de marcadores microssatélites de DNA e seus genótipos utilizados para inferir relações genéticas com os machos e assim reconstruir suas colônias (famílias) de origem, assim como, esses genótipos foram usados para reconstruir o potencial genótipo maternal. Reconstruído o genótipo maternal, foi feita uma análise de parentesco entre machos e rainhas. Após esta análise, a estruturação genética das cinco agregações foi investigada. A distância de dispersão dos machos foi obtida após identificarmos algumas de suas colônias natais e estimar a distância até as agregações, por meio de georreferenciamento dos ninhos da região e análises moleculares. Foram coletados e genotipados 376 machos, nas 5 agregações estudadas, que pertenciam a 83 colônias.. Houve uma média de 4 machos doados por colônia para cada agregação, mas nas agregações a média de machos aparentados era de 1.57. Somente 3.45% dos machos eram aparentados às rainhas. Em média, os machos percorreram 612 metros dos ninhos natais até as agregações.

Palavras-chave: abelhas, agregações, estruturação genética, machos, parentesco, dispersão de ninho

1. Introdução

1.1. Determinação sexual em abelhas

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera e possuem um modo pouco comum de reprodução. Seu sistema de determinação sexual é haplodiplóide possuindo um mecanismo secundário de determinação sexual (*locus csd*) (COOK E CROZIER, 1995; HEIMPEL & BAER, 2008). Por conta desse sistema, as fêmeas são de origem diplóide e os machos haplóides, porém, ovos diplóides e homozigotos para os *locus csd* dão origem a machos diplóides, praticamente inviáveis geneticamente (CAMARGO, 1979; COOK & CROZIER, 1995).

Desse modo, as rainhas de abelhas sem ferrão que se acasalam uma única vez com um único macho (PETERS *ET AL.*, 1999; GREEN & OLDROYD, 2002; PAXTON *ET AL.*, 2003; FERNANDES *ET AL.*, 2012) devem se reproduzir sob um sistema de acasalamento que lhes proporcionem baixas possibilidades de encontrar um macho aparentado.

1.2. Processo de fundação do ninho e acasalamento

As abelhas sem ferrão podem realizar uma reprodução colonial promovendo a fissão do antigo ninho em dois. Para isso, essas abelhas necessitam de cavidades naturais ou artificiais pré-existentes para construírem seus ninhos (NOGUEIRA-NETO, 1997). O oferecimento de ninhos-armadilha tem sido uma técnica alternativa e simples, mas altamente eficiente em capturar enxames na natureza (OLIVEIRA *ET AL.*, 2009; OLIVEIRA *ET AL.*, 2012 – NO PRELO) de modo ambientalmente adequado (CONAMA, 2004).

Durante o processo de fundação, várias operárias da colônia-mãe se deslocam até a cavidade escolhida para receber a colônia-filha e ali iniciam a limpeza da cavidade, seguida do transporte de cerume, resina e alimento (mel e pólen) da colônia-mãe para a filha (NOGUEIRA-NETO, 1954; TERADA, 1972; WILLE & OROZCO, 1975; DARCHEN,

1977; INOUE *ET AL.*, 1984; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000B). Por necessitarem desses materiais de ninho e alimento da antiga colônia, a fundação dos novos ninhos fica condicionada ao alcance de forrageio das operárias que, por isso, tendem a fundar os ninhos próximos da colônia-mãe (NOGUEIRA-NETO, 1954; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000B).

No decorrer dessas atividades, os machos começam a aparecer e aguardar diariamente em frente do ninho mesmo que as rainhas virgens ainda não tenham chegado (NOGUEIRA-NETO, 1954; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000B). Esse processo pode levar vários dias ou semanas até que, finalmente, a rainha virgem migra da colônia-mãe para a colônia-filha (NOGUEIRA-NETO, 1954; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000B). Somente após isso é que a rainha virgem realiza o vôo nupcial e se acasala com um macho no mesmo dia ou poucos dias depois (NOGUEIRA-NETO 1954; KERR *ET AL.*, 1962; WILLE & OROZCO 1975; VAN VEEN & SOMMEIJER 2000B).

Os machos que começam a visitar essas fundações são indivíduos que abandonaram seus ninhos de origem após estarem maduros sexualmente (SCHWARZ, 1948, IMPERATRIZ-FONSECA, 1973; CORTOPASSI-LAURINO, 1979; SAKAGAMI, 1982). Porém, pouco se conhece sobre a origem colonial desses machos de meliponíneos mantidos nas agregações de machos. Uma das primeiras tentativas de estimar a quantidade colônias contribuindo com machos foi feita marcando-se machos de *Scaptotrigona postica* de quatro colônias e observando-os em agregações reprodutivas (KERR *ET AL.*, 1962) concluindo-se que, potencialmente, muitas delas enviam machos.

1.3. Marcadores moleculares de locus microssatélites para estimar aspectos biológicos em abelhas

À medida que novas tecnologias vão sendo criadas, elas vão sendo incorporadas ao estudo da biologia dos organismos, e com abelhas não é diferente. Um dos primeiros trabalhos com abelhas sociais foram feitos para inferir a paternidade e o parentesco entre membros de colônias de *A. mellifera* utilizando marcadores moleculares de microssatélites de DNA (ESTOUP *ET AL.*, 1994). Desde então, não apenas as relações genéticas entre as fêmeas dentro dos ninhos começaram a ser estimadas para outras espécies, mas também com os machos de abelhas sociais agregados para fins reprodutivos (BAUDRY *ET AL.*, 1998; PAXTON, 2000; CAMERON *ET AL.*, 2004; KRAUS *ET AL.*, 2008; COLLET *ET AL.*, 2009; MUELLER *ET AL.*, 2012).

Os microssatélites são pequenas repetições em sequência (1-6 pdb) que se distribuem ao longo de todo o genoma dos indivíduos (QUELLER *ET AL.*, 1993). Esses marcadores são regiões não-codificadoras e não sofrem pressão evolutiva. São, ainda, marcadores codominantes e geralmente bastante polimórficos, o que possibilita inferir com grande acuidade as relações entre indivíduos de uma população (QUELLER & GOODNIGHT, 1989; GOODNIGHT & QUELLER, 1999).

1.4. Outros usos dos marcadores moleculares na ecologia comportamental da abelhas

O uso de marcadores moleculares pode permitir inferir diversos dados biológicos nas abelhas (QUELLER & STRASSMANN, 1998; ARIAS *ET AL.*, 2006; FRANCISCO *ET AL.*, 2006), desde aspectos de parentesco dentro do ninho até a origem colonial das abelhas nas suas viagens de forrageio. Por exemplo, alguns trabalhos utilizaram a marcação molecular de membros de colônias de mamangavas ou abelhas sem ferrão e amostraram indivíduos relacionados geneticamente longe dos ninhos, inferindo assim,

tanto as colônias de origem quanto o potencial de dispersão dos indivíduos de tais ninhos (DARVILL *ET AL.*, 2004; KRAUS *ET AL.*, 2009; CONNOP *ET AL.*, 2011; PIÖKER-HARA, 2011)

Outros trabalhos, utilizando programas específicos (QUELLER & GOODNIGHT, 1989; GOODNIGHT & QUELLER, 1999; KONOVALOV *ET AL.*, 2004) para reconstruir relações genéticas entre indivíduos, têm inferido os genótipos parentais, ou seja, as potenciais rainhas ou parceiras sexuais, a partir dos genótipos da prole (machos e/ ou operárias) (CAMERON *ET AL.*, 2004; KRAUS *ET AL.*, 2005; JAFFÉ *ET AL.* 2009; KRAUS *ET AL.*, 2009; MUELLER *ET AL.*, 2012).

A abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* é umas das espécies do grupo melhor conhecida e estudada (CAMARGO & PEDRO, 2008). Porém, os trabalhos realizados com esta espécie têm investigado pouco sobre a biologia reprodutiva dos machos. Assim, com base nas várias possibilidades oferecidas pelas análises moleculares utilizando marcadores microssatélites, surgem algumas perguntas: (1) Quantas colônias contribuem com machos e quantos indivíduos das mesmas colônias estão nas mesmas agregação de machos de *T. angustula*? (2) há machos aparentados às rainhas-mãe visitando agregações em frente a determinada colônia? (3) as agregações ocorrendo próximas geograficamente e com baixo intervalo de tempo são diferentes geneticamente entre si? (4) é possível estimar o potencial de dispersão dos machos de suas colônias de origem até as agregações reprodutivas? Desse modo, os objetivos do trabalho foram responder às perguntas acima.

2. Materiais e Métodos

2.1. Fundações em ninho-armadilha e coleta de indivíduos

Cinco ninhos em fundação de ninhos de *Tetragonisca angustula* contavam com centenas de machos agregados em frente a cada uma deles. Essas agregações ocorreram em fevereiro de 2011 dentro do *campus* da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto. Três dessas agregações de machos ocorreram no mesmo dia (ninhos-armadilha números 23, 25, 26); a outra agregação ocorreu 11 dias depois (ninho-armadilha 56); e a última outra agregação ocorreu 21 dias depois, sendo fundado na parede de uma sala, no Setor de Entomologia da Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, denominado ninho-armadilha Dani (Tabela 1).

No horário de maior presença desses indivíduos entre 12:00 e 13:00, foi feita uma varredura com rede entomológica a fim de coletar todos os indivíduos machos presentes nestas agregações. Foram coletados no total 378 machos para genotipagem com marcadores moleculares.

Tabela 1. Cinco agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) em ninhos em fundação. *Campus* da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/ São Paulo

Agregação	Local	Quantidade ¹	Tipo de ninho ²	Data	Rainha virgem
1º	USP Ribeirão Preto	52	Ninho-armadilha (NA26) *	02/02/2011	Ausente
2º	USP Ribeirão Preto	98	Ninho-armadilha (NA25) *	02/02/2011	Ausente
3º	USP Ribeirão Preto	58	Ninho-armadilha (NA23) *	02/02/2011	Ausente
4º	USP Ribeirão Preto	16	Ninho-armadilha (NA56)	13/02/2011	Ausente
5º	USP Ribeirão Preto	154	Caixa racional vazia (NADani)	23/02/2011	Recém-acasalada

¹ Estes valores se referem à quantidade de machos coletados nas agregações.

² Os dados entre parênteses representam a numeração recebida pelos ninhos onde os machos se agregavam.

* Agregações simultâneas, ocorridas no mesmo dia.

2.2. Locais dos ninhos e distâncias entre eles

A distância geográfica dos ninhos-armadilha que estavam em processo de fundação e possuíam agregações de machos de *T. angustula* é discriminada na Tabela 2 e pode ser visualizada na Figura 1.

Tabela 2. Distância geográfica, em metros, entre ninhos em fundação com machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) agregados. Campus da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

	NA26	NA25	NA23	NA56	NADANI
NA26	0				
NA25	10	0			
NA23	496	501	0		
NA56	80	87	417	0	
NADANI	277	280	707	325	0

Figura 1. Vista aérea dos pontos geográficos (em amarelo) onde estavam localizados os cinco ninhos em processo de fundação e respectivas agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini). Campus da Universidade de São Paulo, município de Ribeirão Preto. Fonte GoogleEarth.

2.3. Coleta de operárias de ninhos racionais e naturais coletados

Nosso método para coletar operárias consistiu em amostrar operárias com duas funções, ou seja, aquelas fundadoras que produziam o tubinho de cera e ali permaneciam todos os dias ou aquelas sentinelas de ninhos naturais e colmeias que ficam no tubinho de cera (Figura 2). Embora operárias de ninhos diferentes possam ser coletadas incidentalmente, é possível que pelo fato dessa função de guarda em *T. angustula* ser muito especializada (GRÜTER *ET AL.*, 2012) tenha possibilitado uma amostragem fidedigna de indivíduos relacionados àquelas colônias amostradas. Suas guardas tendem a não se afastarem muito da entrada de seus ninhos (WITTMANN, 1985), além de serem altamente especializadas em reconhecer quimicamente operárias coespecíficas de outros ninhos (KÄRCHER & RATNIEKS, 2009). Outro fator que pode ter contribuído para minimizar as chances de não se coletar operárias de outros ninhos é que, com exceção dos ninhos racionais, aqueles naturais são distantes uns dos outros, o que pode contribuir para uma deriva entre colônias perto de zero (FERNANDES *ET AL.*, 2012).

Figura 2. Operárias guardas (sentinelas) de *Tetragonisca angustula*. Foto de Paulo César Fernandes, IB-USP.

Assim, como especificado na seção *Questões Norteadoras* que precede o início dos Capítulos, diversos ninhos naturais e racionais foram georreferenciados e dezenas de ninhos-armadilha foram instalados dentro do *campus* em Ribeirão Preto. Foram encontrados, portanto, 75 ninhos dentre naturais, racionais e em processo de fundação e de cada um desses ninhos foram coletadas 5 operárias guardas, totalizando 380 operárias. Essas operárias foram imediatamente estocadas em etanol (99%) e armazenadas em geladeira por alguns dias e posteriormente transferidas para freezer -20° C até o dia da genotipagem.

2.4. Extração do DNA da amostra

A extração do DNA das 380 operárias e dos 378 machos foi realizada após a secagem de todos os indivíduos armazenados em etanol e removendo-se as cabeças e os metassomas dos mesmos. Em seguida, os tórax de cada um dos indivíduos secados foram individualizados em tubos Eppendorff 1.5mL com Chelex 10% (adaptado de WALSH *ET AL.*, 1991) e macerados. Posteriormente, esses extratos corporais foram incubados em banho-maria a 56° C por 30 min e, em seguida, a 100° C por 5 min. Terminada essa etapa, as soluções foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 min. Foram removidos 100µL do sobrenadante (ácido nucléico).

2.5. Primers e amplificação dos microssatélites por PCR

Foram utilizados seis pares de *primers* específicos para *loci* de microssatélites de *Tetragonisca angustula* (BRITO *ET AL.*, 2009): Tang03, Tang11, Tang12, Tang57, Tang60

e Tang65 (Tabela 3), os quais, após serem descongelados, foram vortexados por 5 segundos e centrifugados por 1 minuto a 14.000 rpm.

Para as reações de amplificação dos microssatélites foi utilizado 1 µl da extração de DNA Chelex, acima citado. As reações foram feitas com um *primer* (M13: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') que é marcado na sua extremidade 5' com os fluoróforos 6-FAM, HEX ou NED separadamente. Além de sua sequência normal, todos os *primers forward* possuem a sequência do M13 na sua extremidade 5'. A mistura de PCR (volume final 5 µl) conteve: 0,5 µl de tampão de PCR 10× (Invitrogen), 0,5 µl de dNTPs 2 mM cada, 0,5 µl de MgCl₂ 50mM, 0,125 µl do *primer* M13 marcado com 6-FAM, HEX ou NED 5µM, 0,1 µl de glicerol 50% e 0,1 µl de *Taq* DNA polimerase 5U/ul (Invitrogen).

Os *primers forward* e *reverse* para cada *locus* foram preparados da seguinte maneira: 1 µl do *primer forward* 10uM acrescido da sequência do M13 na sua extremidade 5' e 10 µl do *primer reverse* 10uM em um volume final de 20 µl; desta solução resultante foram utilizados 0,125 µl para a reação de PCR. Cada reação de PCR será submetida a um ciclo específico descrito na Tabela 3. Os *primers* que foram utilizados para amplificação de 9 *loci* de microssatélites em *T. angustula* são espécie específicos e foram desenvolvidos em nosso laboratório (BRITO *ET AL.*, 2009) (Tabela 2).

Após a amplificação, 9 µl de água Milli-Q foram adicionados a 1 µl da reação de amplificação; 2 µl dessa reação diluída foram adicionados a 7,85 µl de Formamida HI DI (Applied Biosystems) e 0,15 µl do marcador de peso molecular (GeneScan 500 ROX da Applied Biosystems). Essa mistura foi analisada no sequenciador automático [ABI3730 DNA Analyzer](#) (Applied Biosystems) do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Tabela 3. Concentração dos reagentes (μL) da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *em inglês*) para amplificação do lócos de microssatélites de *Tetragonisca angustula*.

Tang57 FAM – CHAMA			
	quantidade de reagentes	quantidade de indivíduos	total
H ₂ O	2.35	378	888.3
Tampão-10x	0.5	378	189
dNTP-2mM	0.5	378	189
MgCl ₂ -50mM	0.2	378	75.6
PrimerDye-5uM	0.125	378	47.25
PrimerF-0.5uM			
PrimerR-5uM	0.125	378	47.25
Glicerol-50%	0.1	378	37.8
Taq-5U/ul	0.1	378	37.8

Foram feitas quatro placas completamente preenchidas para as operárias e quatro para os machos também já que a quantidade de ambos era aproximadamente igual, respectivamente, 380 e 378. Em casos ambíguos ou de não amplificação dos marcadores foi feita uma repetição adicional a fim de diminuir erros e estimativas posteriores.

Tabela 4: Condições de amplificação dos *loci* de microssatélite para *Tetragonisca angustula*.

<i>Lócus</i>	Ciclo de PCR
Tang11	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s., hibridação a 48°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/ 10min.
Tang12	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s., hibridação a 53°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/ 10min.

Tang57	Desnaturação a 95°C/7min.; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 59°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 58,5°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 57°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 56,5°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 56°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 55,5°C/30s e extensão a 72°C/30s; 6 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s, hibridação a 55°C/30s e extensão a 72°C/30s; e extensão extra a 72°C/ 5 min.
Tang60	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s., hibridação a 48°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/ 10min.
Tang65	Desnaturação a 96°C/8min.; 35 ciclos de: desnaturação a 94°C/30s., hibridação a 48°C/1min. e extensão a 72°C/1min.; extensão extra a 72°C/ 10min.

2.6. Análise dos dados

2.6.1. Diversidade genética

Os fragmentos amplificados foram visualizadas no programa *GeneMaker 2.2*. Após a genotipagem dos machos e das operárias (em Anexo, Tabelas 4 e 5, respectivamente), de acordo com seus ninhos de origem ou agregações específicas, respectivamente, esses dados foram analisados quanto aos seguintes aspectos:

A quantidade de alelos por locus, a heterozigose esperada e o desequilíbrio de ligação foram calculados no programa *Genepop 4.1.4* (RAYMOND & ROUSSET, 1995). A

freqüência alélica e a análise de diferenciação da estrutura genética populacional (agregações) pela estimativa ϕ -*statistic* (adequada para dados haplóides e análoga ao F_{ST} , PEAKALL & SMOUSE, 2006) foram feitas para as cinco agregações de machos no programa *Genalex 6.41* (PEAKALL & SMOUSE, 2006). A heterozigose esperada (H_e) e a distância genética de Nei (1978) foram calculadas no programa *Microsatellite Analyser (MSA)* 4.05 (DIERINGER & SCHLÖTTERER, 2003).

A freqüência alélica para dados haplóides

$$\text{Freqüência alélica } x = \frac{N_x}{N}$$

onde, N_x é a quantidade de alelos x e N é a quantidade de amostras. Podendo também ser determinada pela contagem direta da proporção de alelos diferentes.

2.6.2. Colônias de origem e reconstrução do genótipo materno

A análise de possível parentesco entre machos e as operárias genotipadas de cada um dos 75 ninhos, descritos anteriormente, e assim inferir as colônias de origem dos machos, foi feita no programa *Colony 1.2* (WANG, 2004). Por meio de estimativa por máxima verossimilhança, esse programa reconstrói as relações genéticas entre indivíduos assinalando/ inferindo famílias, no presente caso colônias, baseando-se na freqüência alélica da população (WANG, 2004)⁵. O programa *Colony 1.2* é bastante robusto e implementa e/ ou detecta rigorosamente erros de genotipagem e mutação para reconstruir as famílias.

⁵ Havia a possibilidade de se usar Colony 2 que é mais fácil de manejar e possibilita corridas mais longas, não necessitando de repetir corridas. Porém, ele não permite inserir dados haplóides na prole, embora haja a possibilidade de duplicar os alelos ou identificá-los como *missing data* (JINLIANG WANG, Institute of Zoology, Zoological Society of London, Com.Pes.).

O programa *Colony 1.2* também foi utilizado porque ele infere os genótipos parentais com base nas famílias reconstruídas. Desse modo, ao oferecer os genótipos das operárias e dos machos, os genótipos de suas possíveis rainhas-mães foram calculados possibilitando, assim, analisar um possível parentesco dessas potenciais rainhas aos machos amostrados nas agregações. Como será visto mais adiante (Discussão) este programa e este tipo de enfoque tem sido bastante utilizado para estimar colônias de origem e genótipos parentais em insetos sociais.

Foram feitas cinco corridas independentes com diferentes *seeds* (números aleatórios iniciadores das corridas) e os *log* de probabilidade mais altos que retornavam em resultados convergentes (famílias) foram utilizados para reconstrução de consenso, seguindo KRAUS *ET COL.* (2009) e MUELLER *ET COL.* (2012). As famílias e os genótipos das cinco potenciais rainhas associadas às operárias dos cinco ninhos em fundação estão em Anexo, Tabela 7.

2.6.3. Parentesco entre machos e rainhas

Após a inferência das famílias dos machos e das operárias relacionados às suas respectivas colônias de origem e, subsequente, reconstrução dos genótipos das rainhas (*Colony 1.2*), foi feita uma análise de parentesco entre os machos coletados em cada uma das cinco agregações e suas potenciais rainhas. A análise de parentesco foi feita no programa *Kingroup 2* (KONOVALOV *ET AL.*, 2004) que analisa relacionamentos genéticos pareados entre grupos de indivíduos (Figura 3). Foi analisada a hipótese primária de que os machos naquelas agregações seriam filhos das rainhas (0.5) associadas geneticamente àquelas fundações onde os machos estavam agregados. A hipótese nula era que os pares machos-rainha não seriam relacionados geneticamente (0).

Foram utilizados os seguintes parâmetros de análise no programa *Kingroup 2*: opção *Pedigree* seguida de *Kinship - likelihood ratio*. Essa opção assume a probabilidade de compartilhamento de alelos idênticos por descendência (QUELLER & GOODNIGHT, 1989; GOODNIGHT & QUELLER, 1999). O parentesco entre machos e rainhas foi testado com 100.000 simulações pareadas e na opção de ploidia, os indivíduos foram assumidos serem haplodiplóides sendo a haploidia dos machos de origem materna.

Figura 3. Teste de atribuição de parentesco entre machos e rainhas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera Meliponini). A – opções de parentesco seguida de razão de similaridade; B – Haploidia de origem materna. *Software Kingroup*.

A visualização gráfica da genealogia (parentesco) entre os machos relacionados geneticamente às rainhas associadas aos ninhos-armadilha em processo de fundação foi feita no programa *Pedigree Viewer 6.5b* (KINGHORN & KINGHORN 2010).

2.6.4. Estruturação genética das agregações

Foi feita uma análise da estruturação genética das cinco agregações de machos de *T. angustula* no programa *Structure 2.3* (PRITCHARD ET AL., 2000). Este programa

utiliza o método de máxima verossimilhança por meio de algoritmo Monte Carlo em Cadeias de Markov (MCMC, *em inglês*) e infere a estruturação, ou não, de populações⁶ (PRITCHARD *ET AL.*, 2000). Além disso, este programa oferece um bom recurso gráfico para visualizar a composição das populações e a atribuição de um determinado indivíduo pertencer exclusivamente a uma dada população com base no seu genótipo (PRITCHARD *ET AL.*, 2000).

Os parâmetros das corridas foram: 50 corridas (*run*) de repetições aleatorizadas para cada uma das cinco agregações, aqui consideradas como K ($K = 1$ a $K = 5$), totalizando 250 corridas. O período *burn-in* foi padronizado para 100.000 e repetições (*reps*) em 100.000, parâmetros adequados para grandes amostras e expectativa de pouco ou nenhuma estruturação (PRITCHARD *ET AL.*, 2000).

Foi utilizada a hipótese de modelo com mistura (*admixture model*) informando a população de origem dos indivíduos (*locdata*) e a localidade das agregações (*locprior*). Esta informação torna mais acurada as chances de inferir corretamente a origem de um determinado indivíduo à sua população correspondente (FALUSH *ET AL.*, 2003), embora não force uma estruturação genética de uma população caso ela, de fato, não exista (PRITCHARD *ET AL.*, 2000; HUBISZ *ET AL.*, 2009).

Posteriormente, foi utilizado o método de EVANNO *E COL.* (2005), implementado no programa *Structure Harvester* (EARL *ET AL.*, 2012). Esse método “corrige” a superestimativa calculada na quantidade de populações (ou subpopulações), tornando a quantidade de agrupamentos naturais mais realista (EVANNO *ET AL.*, 2005).

⁶ Aqui, o termo populações se refere especificamente às respectivas agregações de onde os machos de *Tetragonisca angustula* foram amostrados.

2.6.5. Distância de dispersão dos machos de suas colônias de origem até as agregações

Foi estimada a distância de dispersão dos machos que puderam ter suas colônias de origem identificadas com base nas famílias (colônias) reconstruídas pelo programa *Colony 1.2*. Das colônias identificadas doando machos foi estimada a distância geográfica entre elas e as agregações onde foram coletados os seus respectivos machos. As colônias já haviam sido previamente georreferenciadas possibilitando, então, utilizar os programas *EasyGPS 4.45* e *GPS TrackMaker 13.8* para estimar a distância geográfica e plotar o gráfico das rotas utilizadas pelos machos (em anexo, Figura 1).

3. Resultados

3.1. Parâmetros de diversidade genética

A quantidade de alelos por locus foi alta, alcançando de 7 a 28. O número médio de alelos por locus (N) foi de 9.8 ± 0.901 , sendo o número efetivo de alelos de 5.2 ± 0.613 (Tabela 5). A heterozigose e a riqueza alélica são representados na Tabela 5. Não houve desequilíbrio de ligação significativo entre os locus para nenhuma agregação ($p > 0.05$) sugerindo que os locus dão estimativas independentes dos parâmetros genéticos populacionais. Dois machos eram diplóides e foram excluídos das análises posteriores.

Tabela 5. Quantidade total de alelos por locus (N), heterozigose esperada (H_e) por locus e riqueza alélica (entre parênteses) nas agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).

	tang57	tang03	tang12	tang11	Tang65	tang60
N	13	7	13	16	28	11
NA26	0.317 (0.78)	0.707 (1.42)	0.879 (2.06)	0.718 (1.46)	0.939 (2.73)	0.809 (1.85)
NA25	0.357 (0.77)	0.687 (1.29)	0.889 (2.28)	0.759 (1.83)	0.922 (2.74)	0.803 (1.82)
NA23	0.375 (0.87)	0.496 (0.99)	0.885 (2.17)	0.647 (1.39)	0.923 (2.54)	0.805 (1.8)
NA56	0.608 (1.16)	0.675 (1.04)	0.883 (1.84)	0.905 (1.95)	0.925 (2.1)	0.650 (1.06)
NADANI	0.413 (1)	0.661 (1.23)	0.841 (2.02)	0.752 (1.76)	0.930 (2.79)	0.819 (1.93)

Figura 4. Número de alelos encontrado nos machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) compondo as cinco agregações. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

Tabela 6. Frequência de alelos do locus Tang57 para os machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).

Locus	Alelo	NA26	NA25	NA23	NA56	NADANI
tang57	N	52	97	57	16	151
	156	0.827	0.794	0.789	0.625	0.762
	158	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
	178	0.019	0.021	0.035	0.000	0.046
	180	0.019	0.021	0.000	0.063	0.007
	184	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007
	192	0.000	0.000	0.000	0.125	0.020
	194	0.019	0.124	0.053	0.063	0.073
	196	0.038	0.010	0.000	0.000	0.033
	198	0.038	0.021	0.053	0.000	0.020
	200	0.019	0.000	0.000	0.000	0.007
	202	0.000	0.010	0.018	0.125	0.026
	204	0.000	0.000	0.035	0.000	0.000
	206	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000

Figura 5. Frequência de alelos do *locus* Tang57.

Tabela 7. Frequência de alelos do *locus* Tang03 para os machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).

Locus tang03	Alelo N	NA26 52	NA25 92	NA23 56	NA56 16	NADANI 150
	201	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000
	217	0.212	0.228	0.089	0.375	0.233
	219	0.481	0.478	0.696	0.438	0.507
	221	0.096	0.141	0.089	0.000	0.140
	223	0.038	0.000	0.000	0.000	0.007
	225	0.135	0.141	0.107	0.188	0.113
	227	0.038	0.000	0.018	0.000	0.000

Figura 6. Frequência de alelos do *locus* Tang03.

Tabela 8. Frequência de alelos do *locus* Tang12 para os machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).

Locus tang12	Alelo N	NA26 51	NA25 98	NA23 57	NA56 16	NADANI 152
	199	0.098	0.071	0.088	0.000	0.066
	205	0.020	0.061	0.088	0.000	0.007
	207	0.176	0.163	0.193	0.250	0.217
	211	0.000	0.020	0.018	0.000	0.007
	215	0.078	0.071	0.193	0.063	0.066
	217	0.176	0.224	0.140	0.188	0.270
	218	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000
	219	0.176	0.051	0.105	0.125	0.145
	221	0.137	0.102	0.018	0.125	0.092
	223	0.078	0.071	0.070	0.000	0.066
	225	0.000	0.061	0.035	0.000	0.033
	227	0.059	0.082	0.053	0.188	0.026
	229	0.000	0.020	0.000	0.000	0.007

Figura 7. Frequência de alelos do locus Tang12.

Tabela 9. Frequência de alelos do locus Tang11 para os machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).

Locus	Alelo	NA26	NA25	NA23	NA56	NADANI
tang11	N	52	98	56	15	145
	180	0.000	0.000	0.036	0.000	0.048
	182	0.212	0.092	0.214	0.200	0.193
	184	0.462	0.439	0.554	0.200	0.428
	186	0.173	0.194	0.089	0.133	0.166
	188	0.000	0.041	0.018	0.200	0.021
	190	0.077	0.020	0.036	0.067	0.034
	194	0.000	0.061	0.018	0.067	0.000
	196	0.000	0.031	0.000	0.000	0.021
	198	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000
	200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021
	202	0.038	0.000	0.000	0.000	0.021
	204	0.000	0.000	0.018	0.000	0.014
	206	0.019	0.031	0.000	0.000	0.007
	208	0.019	0.020	0.000	0.067	0.021
	210	0.000	0.020	0.018	0.067	0.000
	212	0.000	0.020	0.000	0.000	0.007

Figura 8. Frequência de alelos do *locus* Tang11.

Tabela 10. Frequência de alelos do *locus* Tang65 para os machos de *Tetragonisca angustula*

Locus tang65	Alelo N	NA26 52	NA25 97	NA23 58	NA56 16	NADANI 152
	149	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
	188	0.096	0.052	0.017	0.063	0.020
	190	0.077	0.155	0.121	0.125	0.132
	192	0.154	0.186	0.155	0.188	0.112
	194	0.077	0.082	0.103	0.188	0.138
	196	0.019	0.062	0.052	0.000	0.033
	198	0.000	0.021	0.017	0.000	0.000
	200	0.115	0.010	0.000	0.063	0.026
	202	0.058	0.031	0.121	0.000	0.079
	204	0.077	0.031	0.103	0.125	0.059
	206	0.019	0.021	0.017	0.063	0.033
	208	0.019	0.031	0.017	0.000	0.013
	210	0.058	0.021	0.000	0.063	0.053
	212	0.019	0.052	0.052	0.000	0.053
	214	0.019	0.041	0.052	0.125	0.020
	216	0.019	0.021	0.017	0.000	0.046
	218	0.058	0.021	0.034	0.000	0.033
	220	0.019	0.021	0.017	0.000	0.026
	222	0.019	0.041	0.017	0.000	0.033
	224	0.038	0.062	0.086	0.000	0.046
	226	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
	228	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000
	230	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013
	232	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007
	234	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000
	236	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
	238	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000
	240	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007

Figura 9. Frequência de alelos do *locus* Tang65.

Tabela 11. Frequência de alelos do *locus* Tang60 para os machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).

Lócus	Alelo	NA26	NA25	NA23	NA56	NADANI
tang60	N	50	98	58	16	151
	137	0.000	0.010	0.017	0.000	0.007
	139	0.140	0.061	0.069	0.000	0.079
	141	0.080	0.153	0.155	0.063	0.093
	143	0.080	0.020	0.052	0.063	0.046
	145	0.020	0.031	0.052	0.000	0.040
	147	0.360	0.337	0.224	0.438	0.305
	149	0.200	0.214	0.345	0.438	0.252
	151	0.060	0.041	0.069	0.000	0.073
	153	0.020	0.122	0.017	0.000	0.040
	155	0.020	0.010	0.000	0.000	0.066
	157	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000

Figura 10. Frequência de alelos do *locus* Tang60.

3.2. Distância genética de Nei

A distância genética de Nei para os dados dos machos das cinco agregações revelou que a agregação NA26 foi mais próxima geneticamente de NADani que ocorreu 21 dias depois dela, do que NA25 que ocorreu no mesmo dia. Pode-se observar, também, que a agregação NA23 foi a mais distante geneticamente em relação a todas as outras quatro agregações (Tabela 12; Figura 4).

Tabela 12. Distância genética de Nei (1978) para as cinco agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).

	NA26	NA25	NA23	NA56	NADANI
NA26	0.00000				
NA25	0.00098	0.00000			
NA23	0.01687	0.02785	0.00000		
NA56	0.01136	0.01989	0.06327	0.00000	
NADANI	-0.00995	0.00379	0.01898	0.01096	0.00000

Figura 11. Dendrograma utilizando a distância genética de Nei de cinco agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini). Coeficiente de correlação cofenética: 0.957; *Past* 2.15.

3.3. Diferenciação genética – estimativa ϕ_{PT}

A análise geral da diferenciação genética ϕ_{PT} relacionando todas as agregações conjuntamente não revelou diferença entre elas ($\phi_{PT} = 0.011$; $p = 0.19$). Porém, na análise pareada, *a posteriori*, foi possível verificar que a agregação NA23 foi diferente em todas as comparações pareadas com cada uma das outras agregações (NA26, NA25, NA56 e NADani). Esta foi a agregação mais distante e isolada geograficamente das outras quatro agregações.

Tabela 13. Comparação par a par da diferenciação genética populacional (ϕ_{PT}) entre cinco agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini).

Agregações		PhiPT	p-value
NA26	NA25	0.001	0.370
NA26	NA23	0.007	0.040*
NA25	NA23	0.011	0.010*
NA26	NA56	0.008	0.190
NA25	NA56	0.010	0.220
NA23	NA56	0.027	0.030*
NA26	NADANI	0.000	0.470
NA25	NADANI	0.002	0.150
NA23	NADANI	0.008	0.040*
NA56	NADANI	0.005	0.260

3.4. Colônias contribuindo com machos

Foram encontradas conjuntamente 83 colônias contribuindo com machos para as cinco agregações reprodutivas, sendo que 33 delas foram colônias genotipadas e georreferenciadas neste estudo (Tabela 14)

Tabela 14. Machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) e suas colônias de origem no campus da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. A numeração nas linhas indicam a identificação de cada um dos 376 machos coletados nas agregações próximos de ninhos-armadilha (NA26, NA25, NA23, NA56, NADANI). Barras (/) indicam ausência de machos provenientes das colônias inferidas(ID).

NA26	NA25	NA23	NA56	NADANI	Colônias	ID	Total
/	85	156, 175	/	236	1	CHNR04	4
/	/	178, 179	/	/	2	CHNR26	2
5	65, 71, 72, 109	198	/	246, 251, 275, 341, 378	3	157***	11
/	117	208	/	229, 268	4*	NA89	3
/	141	160, 180, 188	216, 219	245, 259, 270, 277, 308, 370	5	YARA**	12
6	/	192	/	242, 353, 357	6	MTRILHA***	5
33, 42	116, 128	/	/	262, 265, 296	7	CHNR06	7
40	/	155	/	321, 333	8	CONSUL***	4
29, 31	/	/	/	319	9	CHNR42	3
19	81, 94, 136	/	213	/	10	CHNR24	5
/	/	/	/	326	11	CHNR27	1
11, 12, 23, 24	121	168	214	250, 257, 297, 311, 331	12	CHNR11	12
/	110	/	/	322, 343	13	49***	3
/	/	/	/	253	14	CHNR40	1
/	98	/	/	/	15*	NA19	1
/	/	/	/	359	16	CHNR01	1
/	68	/	/	299, 348	17	CHNR18	3
/	/	/	/	286	18	MESAMELIP**	1
34	/	/	/	/	19	CHNR36	1
15, 51	90	152, 158	/	264, 278, 294	20	CHNR02	8
30	146	172, 174	/	226, 227, 260	21	ALMOX**	7

20	114, 125, 147	154	/	349	22	CHNR08	6
/	107	/	/	/	23	CHNR22	1
22, 37	115, 130	164	/	238	24	42***	6
/	/	/	215	335	25	CHNR19	2
8	/	/	/	/	26	CHNR33	1
28	/	/	/	290, 327	27	1***	3
/	/	/	/	232	28	CHNR43	1
/	/	/	/	295	29	CHNR25	1
/	122, 129	181, 190	/	310, 362	30	CHNR12	6
/	61	/	/	338	31	TRONQUINHO**	2
46	/	/	212, 221	/	32*	NA90	3
1, 2	137	162, 206	/	230, 233, 323	33	/	8
/	56, 58, 67, 80,	182	/	258, 261, 267, 282,	34	/	10
48	140	166	/	376	35	/	6
/	/	/	/	247, 363, 369	36	/	1
/	77, 118	/	/	336	37	/	5
18, 39	60	183	/	285, 324, 352	38	/	6
/	99	/	/	292, 354	39	/	3
/	82	/	/	228, 281	40	/	4
/	75	/	209	283, 345, 346	41	/	6
/	78, 132	/	/	309, 312, 325, 334	42	/	5
38, 43	119	/	/	263, 288, 367	43	/	8
/	57	169, 207	/	249, 272, 273,	44	/	4
/	86	191, 193	/	307, 372	45	/	4
/	76	142	/	298	46	/	3
9	91	189	/	361	47	/	4
3, 50	111	/	/	276	48	/	5
/	135	/	/	342	49	/	3
44	105, 113, 126	/	/	351, 357	50	/	6
/	161, 203	/	/	254, 320	51	/	4
/	55, 112, 143	/	/	291, 368	52	/	3
21	82	199	/	302, 303	53	/	4
/	92, 100	200	225	/	54	/	5
/	148	159	/	306	55	/	4
/	88	/	220	339	56	/	5
/	150	204	/	314, 364	57	/	5
4	/	202	210	280, 289, 305	58	Rainha Dani	5
17, 42	96	187	/	240, 279, 284, 358	59	/	7
10	/	/	/	237, 330	60	/	3
26	62	/	224	269, 332, 356	61	/	4
41	54, 93, 123, 138	177, 205	/	239, 315	62	/	12
/	124	194	/	234	63	/	5
13	/	173	/	231, 244, 301, 344	64	/	4
35, 36	/	165	/	241, 337	65	/	5
/	/	/	/	248, 318	66	/	1
/	/	/	222	235, 340	67	/	4
47	145	163	/	366	68	/	4
/	/	/	223	256, 373, 375	69	/	3
16, 32	66, 89	/	/	360	70	/	6
/	63, 95	196	/	243, 329	71	/	4
25	53	184	/	293, 365	72	/	3
				328			
				/			

/	/	195		73	Rainha 23	1
/	101, 134	197	/	371	/	4
/	79	/	/	/	/	2
	73, 102, 103, 127,					
/	139	151, 170	/	350	/	8
45	108	176, 185	/	255, 374	/	6
	64, 70, 106, 131,					
/	133, 144	153, 186	/	252	Rainha 25	9
/	74	/	/	/	/	1
				271, 274, 287, 300,		
/	69, 83, 84, 97	201	211	355	/	11
7, 14	/	167	/	304, 316, 317	/	6
27	59, 104, 149	/	218	266, 313, 347	/	8
/	52, 87	/	217	/	/	3

* Ninhos-armadilha. ** Ninhos racionais do Depto. de Entomologia . *** Ninhos Racionais do Depto. de Genética.

Em média, 35% das colônias genotipadas e georreferenciadas puderam ser identificadas (Tabela 15). Houve uma média de 4.56 machos doados por ninho com mínimo de 1 e máximo de 12 indivíduos por colônia (Figura 12). A distribuição de Poisson teve um valor de p marginalmente significativo (0.045) com λ 4.56. Analisando os dados esperados verifica-se que as quantidades esperadas no começo e no final da distribuição se afastam, mas tendem a seguir uma distribuição de Poisson de $\lambda = 4$.

Tabela 15. Quantidade total e porcentagem de colônias doando machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) por agregação de machos. *Campus* da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/ São Paulo.

	NA26	NA25	NA23	NA56	DANI
Colônias inferidas	36	59	42	14	70
Colônias identificadas	16	17	14	5	25
% identificação	44.4%	28.8%	33.3%	35.7%	35.7%

Figura 12. Quantidade de machos doados por ninho. Linha vermelha = distribuição de Poisson esperada.

3.5. Genótipos das rainhas e parentesco com os machos

Os genótipos das rainhas, inferidos pelo programa *Colony 1.2*, estão representados na Tabela 16 e os machos que foram relacionados geneticamente às rainhas das operárias nas agregações estão representados na Tabela 17 e Figura 13. O parentesco entre potenciais pares de indivíduos (rainhas vs. machos) foi bastante baixo. Somente 13 machos, de 376 possíveis, foram altamente aparentados às potenciais rainhas representando, assim, 3.45% do total de indivíduos.

Tabela 16. Genótipos potenciais de cinco rainhas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae) cujas operárias foram coletadas em cinco fundações. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Fundação	tang57	tang03	tang12	Tang11	tang65	tang60
RAINHA NA26	184/186	189/211	215/223	184/188	192/226	147/147
RAINHA NA25	156/186	219/219	217/227	180/184	210/224	141/147
RAINHA NA23	156/194	217/219	207/217	196/200	192/226	141/149
RAINHA NA56	184/184	209/219	217/227	180/184	190/192	147/147
RAINHA DANI	156/200	219/219	199/217	186/194	220/220	145/147

Tabela 17. Machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) altamente aparentados às rainhas de cada agregação.

Agregação	♂ filhos da rainha	p-value
NA 25	64	*
NA 25	70	*
NA 25	106	**
NA 25	131	**
NA 25	133	**
NA 25	144	*
NA 23	195	*
NA56 ¹	209	*
NA Dani	279	***
NA Dani	284	*
NA Dani ¹	336	***
NA Dani	358	**

Figura 13. Representação gráfica de relacionamento dos machos (195, 64, 70, 106, 131, 133, 144, 209, 279, 284, 336 e 358) de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) que foram inferidos serem relacionados geneticamente com as rainhas nas agregações (Tabela 17). *Pedigree Viewer*.

3.6. Estruturação genética das agregações

Não houve estruturação genética entre as cinco agregações reprodutivas de machos de *T. angustula*. O valor médio de α (estimador de estruturação do programa *Structure*) foi de 3.378: valores de $\alpha > 1$ indicam ausência de estruturação populacional. Concordantemente, o valor médio de r^2 (estimador de quão bem as informações predefinidas foram úteis em atribuir exclusividade a uma dada agregação do programa *Structure*) foi de 3.092. Valores de $r^2 > 1$ indicam que os dados de localidade são pouco informativos em atribuir um dado membro exclusivamente à população (no caso, agregação) correspondente. Esses parâmetros podem ser visualizados na Figura 14.

Figura 14. Atribuição para os machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenopteta: Meliponini) avaliados em cinco agregações. Cada um dos machos amostrados nas agregações está representado pelas barras verticais coloridas. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem de seu genoma compartilhado com os outros grupos (NA26; NA25; NA23; NA56, NADANI). Eixo Y: coeficiente de participação de um indivíduo em um determinado grupo (Q). Eixo X: cinco subpopulações, ou agregações estudadas. BarPlot (*Structure*).

Após obter os resultados do programa *Structure* e analisá-los pelo método de EVANNO *e col.* (2005) no programa *Structure Harvester* (EARL & VONHOLDT, 2012), pode-se verificar o valor ótimo de K que apontou dois subagrupamentos (*clusters*). Esse valor ótimo, Delta K (Tabela18; Figura 15) concorda com a análise de ϕ -*statistic*, onde a agregação NA23 diferiu de todas as outras agregações. Assim, mesmo não havendo estruturação genética entre as agregações, há dois subagrupamentos⁷.

⁷ Delta K é a estimativa que mais se aproxima do cenário analisado (DENT EARL 2012, Center of Biomolecular Science and Engineering, University of California - com. pess.).

Tabela 18. Dados parciais dos resultados da análise da estruturação populacional no *Structure* reanalisados pelo método de EVANNO e col. 2005 no *Structure Harvester* (EARL & VONHOLDT 2012). K = quantidade de subgrupos que melhor preenchem os dados.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
2	50	-4325.1933	69.8658	-153.325833	83.179167	1.190556

3.7. Dispersão dos machos

Dos 376 machos genotipados, 116 tiveram seus ninhos de origem identificados.

A distância de seus ninhos de origem até as agregações onde eles foram coletados foi estimada e teve uma média de deslocamento foi de 612 ± 434 m, com mínimo de 10 m e máxima de 1.677 m (Tabela 19; Figura 15; Anexo, Figura 1).

Tabela 19. Colônias inferidas que doaram machos de *Tetragonisca angustula* (Meliponini) e a distância até as cinco agregações (DANI, NA25, NA26, NA23, NA56). Universidade de São Paulo/ Ribeirão Preto.

DANI	Distância	NA25	Distância	NA26	Distância	NA23	Distância	NA56	Distância
YARA	10.0	CHNR02	228.7	CHNR42	185.1	157*	75.6	NA90	291.5
CHNR19	12.0	NA19	243.2	CHNR02	232.9	MTRILHA	75.6	YARA	325.7
ALMOX	15.0	NA89	267.7	NA90	263.0	CONSUL	75.6	CHNR19	333.1
MESAMELIP	19.0	YARA	274.7	ALMOX	277.1	42	75.6	CHNR24	999.8
CHNR18	27.0	CHNR18	280.6	CHNR22	322.3	CHNR26	216.8	CHNR11	1125.5
NA89	75.5	ALMOX	280.6	CHNR33	478.3	CHNR02	413.6		
CHNR42	119.4	CHNR22	314.2	1	555.0	NA89	645.8		
CHNR43	241.6	CHNR24	554.9	42	555.0	CHNR04	692.6		
NA25	281.7	157	559.6	MTRILHA	555.0	YARA	707.4		
CHNR01	414.2	49	559.6	CONSUL	555.0	ALMOX	707.4		
CHNR02	510.4	42	559.6	157	555.0	CHNR12	753.5		
157	774.8	TRONQUINHO	559.6	CHNR36	520.7	CHNR11	760.1		
MTRILHA	774.8	CHNR04	881.1	CHNR24	555.0	CHNR06	935.4		
CONSUL	774.8	CHNR06	1,149.5	CHNR11	1,212.0	CHNR08	1037.3		
49	774.8	CHNR11	1,212.0	CHNR06	1,364.8				
42	774.8	CHNR12	1,363.5	CHNR08	1,523.2				
1	774.8	CHNR08	1,530.0						
TRONQUINHO	774.8								
CHNR25	788.3								
CHNR04	849.4								
CHNR27	897.3								
CHNR12	1,300.7								
CHNR11	1,318.0								
CHNR06	1,442.3								
CHNR40	1,612.7								
CHNR08	1,677.3

Figura 15. Distância de deslocamento dos machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) dos ninhos de origem até as agregações reprodutivas.

4. Discussão

4.1. Diversidade genética entre as agregações

Os marcadores utilizados no presente estudo foram altamente variáveis. A grande variabilidade possibilitou detectar diferenças, sutis, mas significativas na agregação NA23, geograficamente mais distante de todas as agregações. Adicionalmente, a análise de distância genéticas de Nei (D_A), que assume o valor máximo de 1 quando menos haplótipos uma amostra (no caso de machos agregados) compartilha com outra (JAFFÉ ET AL., 20009). Portanto, no presente estudo podemos inferir que a agregação NA23 foi visitada por machos de genótipos distintos das outras sendo aquela que mais se afastou significativamente do ponto de vista genético das outras quatro agregações (NA26, NA25, NA56 e NADANI).

4.2. Machos provenientes das mesmas colônias nas agregações

Embora a quantidade média de machos de *T. angustula* liberados por colônia tenha sido 4.5 e algumas delas terem ocasionalmente liberados mais de 10 indivíduos, a quantidade de machos provenientes das mesmas colônias em uma dada agregação foi muito baixa, 1.57. Essa informação é muito interessante porque vários machos podem ser produzidos em um determinado momento (VAN VEEN & SOMMEIJER 2000B; PRATO, 2010) e abandonar seus ninhos juntos (CORTOPASSI-LAUTINO, 1979; CAPÍTULO 3). Com isso em mente, poderíamos sugerir que os irmãos/ primos fossem para as mesmas agregações.

Porém, nossos dados nos levam a pensar de outra forma. Os outros machos que poderiam ser seus irmãos/ primos nas mesmas agregações estavam dispersos em outras agregações na localidade. Assim, muitas vezes, um único indivíduo estava representando isoladamente suas colônias de origem. Em abelhas melíferas, esse também parece ser o caso. Essa dispersão de machos de uma mesma colônia para agregações diferentes também é encontrada para os zangões de *Apis mellifera* (KOENIGER ET AL., 2005A).

Nos machos de abelha sem ferrão de outras espécies, como *Scaptotrigona depilis*, *Trigona collina* e *Scaptotrigona mexicana*, a quantidade de machos provenientes das mesmas colônias e encontrados nas mesmas agregações também é bastante baixa, alcançando, por vezes, no máximo uma dezena de indivíduos (PAXTON 2000; CAMERON ET AL. 2004; KRAUS ET AL. 2005).

Essa tendência das agregações serem representadas por poucos machos de uma mesma colônia parece ser bem comum em abelhas sociais. Por exemplo, em *Apis mellifera*, de 142 zangões amostrados em uma área de congregação havia apenas um grupo com quatro irmãos, seis grupos de seis irmãos, 20 grupos de 2 irmãos e 80

indivíduos isolados (BAUDRY *ET AL.*, 1998). Ou seja, mesmo os machos de *A. mellifera* que tendem a se congregarem perto de seus ninhos de origem (KOENIGER *ET AL.*, 2005B), o que aumentaria as chances de encontrar indivíduos relacionados nas mesmas agregações, distribuem-se nas congregações que ocorrem na área em um determinado momento.

4.3. Quantidade de colônias contribuindo com machos

De um modo geral, muitas colônias contribuem para a formação de agregações reprodutivas. No presente estudo, foi estimada a contribuição de 83 colônias doando 378 machos para as cinco agregações estudadas. Em abelhas melíferas, onde as áreas de congregações podem ser formadas por milhares de indivíduos, há a contribuição de centenas de colônias doando machos para esses eventos. Por exemplo, de uma amostra de 142 zangões de um total de 2123 em uma área de congregação, foi estimada a contribuição de pelo menos 238 colônias (BAUDRY *ET AL.*, 1998). Já, outra área de congregação de zangão contendo cerca de 410 zangões foi estimada que pelo menos 100 colônias estavam contribuindo com machos na quantia de 1-8 machos por colônia (COLLET *ET AL.*, 2009).

A representatividade das colônias nas agregações de machos de abelhas sociais parece ser de muitas colônias doando alguns e poucas colônias doando muitos machos. BAUDRY *ET COL.*, 1998 e CAMERON *ET COL.*, 2004 têm sugerido que os eventos reprodutivos em abelhas sociais parecem seguir, ou tender, a uma distribuição de Poisson com o $\lambda < 1$. No presente estudo, foi verificado que o λ ficou em 4.5 sendo marginalmente significativo ($p = 0.045$). Portanto, pelo menos com os dados presentes e com a espécie aqui estudada, as agregações de machos de *T. angustula* parecem ter tido uma

contribuição um pouco maior de machos/colônias do que aquelas estudadas em outras espécies (BAUDRY *ET AL.*, 1998; CAMERON *ET AL.*, 2004).

Nosso estudo com machos de *T. angustula* faz coro, portanto, com os outros estudos feitos com abelhas sem ferrão: as agregações reprodutivas de machos recebem a contribuição de muitas colônias de uma dada região, mais do que provenientes majoritariamente de umas poucas colônias locais (PAXTON, 2000; CAMERON *ET AL.*, 2004; KRAUS *ET AL.*, 2005; 2008; MUELLER *ET AL.*, 2012). Um trabalho recente ilustra ainda melhor este cenário, pois em uma agregação de machos de *Scaptotrigona mexicana* que ocorria dentro de um meliponário cercado por diversas outras colônias da mesma espécie, não havia nenhum macho proveniente do meliponário, todos vieram de fora do meliponário (MUELLER *ET AL.*, 2012).

4.4. Estruturação genética das agregações

Das 5 agregações de machos de *T. angustula* estudadas geneticamente, 3 ocorreram no mesmo dia, mas a uma certa distância umas das outras e as outras duas aconteceram somente alguns dias depois destas três. Por estarem separadas geograficamente ou com certo intervalo de tempo entre elas, tais agregações poderiam estar estruturadas geneticamente, como unidades reprodutivas. Porém, como a produção de machos nas colônias de meliponíneos ocorre durante todo o ano (BEGO, 1982; SAKAGAMI, 1982) e eles não tendem a se deslocarem preferencialmente para agregações específicas, visto acima, a probabilidade de machos aparentados estarem em agregações diferentes torna essas agregações muito parecidas geneticamente.

Porém, independente dessa maior distância genética todas as agregações foram muito similares geneticamente entre si. Até mesmo a agregação registrada no ninho-armadilha NA23, que parece ter recebido a visita de machos com genótipos um pouco

mais diferentes, não apresentou estruturação genética possivelmente porque havia ainda a participação de machos com genótipos semelhantes aos das outras agregações. No entanto, é provável que muitas colônias do *campus* e arredores não tenham sido identificadas (área arborizada e de difícil acesso nas proximidades) e machos provenientes destas colônias tenham contribuído com novos genótipos. Essa hipótese pode ser testada em trabalhos futuros.

Outro fator que pode ter contribuído para a não estruturação genética das agregações é que o intervalo de tempo de coleta dos machos coletados foi de apenas 3 semanas, o que estaria dentro do ciclo de vida dos machos (CORTOPASSI-LAURINO, 1979; SAKAGAMI, 1982). Isso quer dizer que machos de uma mesma geração (coorte) e provenientes das mesmas colônias poderiam ter visitado as agregações em locais e intervalos de tempos diferentes homogeneizando geneticamente as agregações. MUELLER E COL. (2012) também verificaram que dentro de um intervalo de 4 semanas, os genótipos dos machos de *S. mexicana* que visitavam uma determinada agregação eram muitos semelhantes geneticamente entre si. Talvez essa possível estruturação genética entre agregações de machos de uma mesma localidade possa ocorrer somente com um intervalo de tempo maior entre uma coleta e outra, como relatam JAFFÉ E COL. (2009), após reamostrarem zangões de *A. mellifera* em uma área de congregação com um grande intervalo de meses entre uma coleta e outra.

Com os resultados até agora apresentados e discutidos sobre a diversidade e a estruturação genética das agregações de machos de *T. angustula* fica claro que as rainhas que eventualmente migrariam para as colônias em processo de fundação entrariam em contato com uma rica diversidade de machos locais. Porém, devido os machos provenientes das mesmas colônias estarem distribuídos entre as agregações, e não reunidos em uma única, teoricamente, as rainhas poderiam ser fecundadas por

machos genotipicamente representados em qualquer uma das outras agregações estudadas. Do ponto de vista das colônias que estão enviando machos para as agregações, essa estratégia reprodutiva dos machos de se *pulverizarem* no ambiente parece aumentar as chances delas serem representadas na próxima geração. Uma hipótese que pode ser explorada em trabalhos posteriores.

4.5. Parentesco entre machos e rainhas

No presente trabalho pudemos demonstrar que em agregações de machos de *T. angustula*, a quantidade de possíveis machos relacionados geneticamente com as rainhas-mãe das colônias sendo fundadas foi de 3.19%. Essa baixa porcentagem de machos em agregações reprodutivas relacionados geneticamente a fêmeas utilizando o enfoque de reconstrução do genótipo parental a partir da prole (machos e operárias) está de acordo com outros estudos feitos com abelhas sem ferrão e melífera (CAMERON *ET AL.* 2004; KRAUS *ET AL.*, 2005; JAFFÉ *ET AL.* 2009; KRAUS *ET AL.* 2008; MUELLER *ET AL.* 2012).

Como já citado, a produção de machos, por uma determinada colônia, poder ser muito alta em determinadas épocas do ano, assumindo valores de 0-12% (VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000B) a 30-40% (PRATO, 2010). Porém, assumindo que há uma grande dispersão entre diferentes agregações pelos machos provenientes das mesmas colônias (discutido acima), espera-se um baixo relacionamento genético entre possíveis pares sexuais de indivíduos nas agregações. Isso pode ser altamente eficiente em evitar acasalamentos consanguíneos e as limitações que o sistema de determinação sexual haplodiplóide e o locus de determinação sexual complementar impõem a este grupo de insetos (COOK & CROZIER, 1995).

Devido às graves conseqüências que um acasalamento endogâmico em abelhas sem ferrão pode ter ao produzir machos diplóides (CAMARGO, 1979; 1982; ALVES *ET AL.*,

2011), esta estratégia de agregação dos machos com diversos outros indivíduos vindos das mais variadas colônias da localidade, sendo que pouquíssimos são aparentados entre si e às rainhas, parece ser uma das melhores soluções evolutivas desenvolvidas para evitar a carga genética imposta pela haplodiploidia (COOK & CROZIER, 1995). Considerando ainda que as colônias-filhas se distanciam muito pouco das colônias-mães, pelo sistema de enxameagem dos Meliponini (NOGUEIRA-NETO, 1954; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000A), a grande diversidade genética dentro das agregações de machos (PAXTON, 2000; CAMERON *ET AL.*, 2004; KRAUS *ET AL.*, 2008; MUELLER *ET AL.*, 2012) minimiza o baixo potencial de dispersão das fêmeas e possíveis encontros endogâmicos.

4.6. Dispersão dos machos de seus ninhos de origem até as agregações reprodutivas

Porque os machos provenientes das mesmas colônias tendem a se distribuírem entre as agregações, mais do que permanecerem nas mesmas agregações que seus irmãos/ primos? Se os machos de abelhas sem ferrão tendem a abandonar seus ninhos todos ao mesmo tempo (trabalho atual), ou próximo disso (CORTOPASSI-LAURINO, 1979), porque não ficam todos juntos e se dirigem para as mesmas agregações? No momento não é possível responder essas perguntas, mas o fato de os machos não voltarem mais para seus ninhos (CORTOPASSI-LAURINO, 1979; ENGELS *ET AL.*, 1997) pode ser uma pista. Por não terem um lugar fixo para pernovernar é bem provável que eles se desloquem diariamente ao longo do ambiente e, assim, gradualmente vão se separando uns dos outros. Concomitantemente, por não poderem retornar para seus ninhos de origem e, assim, vagarem pelo ambiente (ENGELS *ET AL.*, 1997), as distâncias de dispersão encontradas de 1.6 km para alguns indivíduos pode ser, de fato, uma distância percorrida ao longo de alguns dias, passo a passo, mais do que um vôo direto do ninho de origem à agregação reprodutiva.

Embora a distância de 1.6 km tenha sido mais rara, o fato de os machos percorrem, em média, uma distância de ≥ 600 metros parece ser uma boa taxa de dispersão de seus ninhos de origem até as agregações, considerando que as colônias-filhas possuem um potencial de deslocamento menor que isso (NOGUEIRA-NETO, 1954; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000A). Essa distância, relativamente alta de dispersão realizada pelos machos, está de acordo com trabalhos feitos com outras espécies de abelhas sem ferrão que, ao genotiparem colônias locais, observaram grande quantidade de machos provenientes de ninhos de outras localidades (PAXTON, 2000; CAMERON *ET AL.*, 2004; KRAUS *ET AL.*, 2009; MUELLER *ET AL.*, 2012).

Esta distância média (≥ 600 metros) percorrida pelos machos de *T. angustula* é muito semelhante à distância máxima prevista para operárias de *T. angustula* (ARAÚJO *ET AL.*, 2004) e até bem acima da distância média de forrageio dessas operárias de *T. angustula* (NIEUWSTADT & IRAHETA, 1996). Outro estudo alinhado com nossos resultados demonstra que machos de *S. postica* marcados em agregações reprodutivas e liberados a várias distâncias, a maioria retorna até 600 m, mas acima de 650 nenhum macho retorna (KERR *ET AL.*, 1962). Essa distância de vôo dos machos de *S. postica* também é próxima da verificada para as suas operárias, 680 m (KERR *ET AL.*, 1962). Portanto, parece haver uma queda acentuada no potencial de deslocamento dos machos à medida que a distância dos eventos reprodutivos aumenta. Devido à grande fragmentação dos ambientes naturais, o modo de dispersão dos machos de *T. angustula* aliada ao baixo parentesco nas agregações são fatores que contribuem significativamente para minimizar o vórtex de extinção predito por ZAYED & PACKER (2005) e ZAYED (2009).

CAPÍTULO 5

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE MACHOS DE *TETRAGONISCA ANGUSTULA* (MELIPONINI) EM AGREGAÇÕES REPRODUTIVAS

Abstract

Analysis of diversity of bees from one locality can contribute to the population management and conservation. There are several ways to assess the diversity of organisms and morphometric characters in bees are one of them, an area that has grown in recent years. In order to evaluate whether some morphological measures would be effective in analyzing three male populations of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini), measurements were taken of seven morphological characters of these individuals whose populations were of Campinas, Sao Paulo and Ribeirão Preto. 30 males were collected from each locality and the measurements were: (1) head width, (2) head height, (3) interorbital distance, (4) length of the thorax, (5) inter-tegular distance, (6) length forewing, (7) width of the forewing. We conducted a multivariate analysis of variance, a principal component analysis and discriminant analysis, and Mahalanobis distance. The morphometry was effective in detecting significant variation between groups (Wilk's $\lambda = 0.33$, <0.001). The first two principal components explained 76.9% of the variation between groups. The discriminant function had a good accuracy in separating individuals according to their location (São Paulo - 50%; Campinas - 70%; Ribeirão Preto - 90%). The populations of males of Campinas and São Paulo, cities that are closer together than the two Ribeirão Preto, were also closer morphometrically. The length and width of the forewing were two of four variables that best ordered groups of male of *T. angustula*. We could demonstrate that the morphology was efficient and practical for making changes in characters and sort groups of individuals, in this case, males of *T. angustula* according to their populations. Because the wings were good predictors of the variation analyzed, this structure, if analyzed from the perspective of geometric morphometrics, more than the traditional one used here, can answer important questions about reproductive biology such as patterns of size and symmetry among groups of individuals and implication for mating.

Key-words: Morphometry, males, stingless bees, reproductive aggregations

Resumo

Análises de diversidade de abelhas de uma localidade podem contribuir para planos de manejo e conservação da população. Há vários meios de se avaliar a diversidade de organismos e a morfometria de caracteres em abelhas é uma área que tem crescido nos últimos anos. A fim de avaliar se algumas medidas morfológicas seriam eficientes em analisar três populações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) foram tomadas medições de 7 caracteres morfológicos desses indivíduos cujas populações eram de Campinas, São Paulo e Ribeirão Preto. Foram coletados 30 de cada localidade e as medidas foram: (1) largura da cabeça; (2) altura da cabeça; (3) distância interorbital; (4) comprimento do tórax; (5) distância inter-tegular; (6) comprimento da asa anterior; (7) largura da asa anterior. Foi feita uma análise de variância multivariada, uma análise de componentes principais e uma análise discriminante, além da distância quadrada de Mahalanobis. A morfometria foi eficiente em detectar variação significativa entre os grupos (Wilk's $\lambda = 0.33$; < 0.001). Os dois primeiros componentes principais explicaram 76.9% da variação entre os grupos. A função discriminante teve uma boa acuidade em separar os indivíduos de acordo com sua localidade (São Paulo – 50%; Campinas – 70%; Ribeirão Preto – 90%). As populações de machos de Campinas e São Paulo, cidades que são mais próximas entre si do que as duas de Ribeirão Preto, também foram mais próximas morfometricamente. O comprimento e a largura das asas anteriores foram duas, de quatro, variáveis que melhor ordenaram os grupos de machos de *T. angustula*. Pudemos demonstrar que a morfometria foi eficiente e prática para a tomada de variação de caracteres e ordenar grupos de indivíduos, no caso, machos de *T. angustula* de acordo com suas populações. Devido as asas analisadas terem sido boas preditoras de variação, essa estrutura se analisada sob a perspectiva da morfometria geométrica, mais do que a tradicional utilizada aqui, poderá responder importante perguntas sobre biologia reprodutiva como padrões de tamanho e simetria entre grupos de indivíduos e suas possíveis implicações para o acasalamento.

Palavras-chave: Morfometria, machos, abelhas sem ferrão, agregações reprodutivas

1. Introdução

A reprodução das abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) é caracterizada pelo vôo nupcial de uma rainha virgem na presença de centenas de machos que se agregam para fins reprodutivos próximos de ninhos coespecíficos ou em fundação (MICHENER, 1946; NOGUEIRA-NETO, 1954; KERR, *ET AL.*, 1962; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998; VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000A) ou em sítios de congregação, substratos não relacionados a ninhos específicos (SOMMEIJER & BRUIJN, 1995; SOMMEIJER *ET AL.*, 2003).

Essas agregações de machos de abelhas sem ferrão são compostas por indivíduos provenientes de diversas colônias de uma determinada região e geralmente representam sozinhos ou em pequenos grupos de irmãos suas colônias de origem (PAXTON 2000; CAMERON *ET AL.* 2004; KRAUS *ET AL.*, 2008; MUELLER *ET AL.* 2012; CAPÍTULO 4). Desse modo, os machos de abelhas sem ferrão que visitam as agregações reprodutivas são uma boa estimativa da população de uma determinada localidade. Somado a isso, deve-se considerar que eles podem percorrer distâncias consideráveis de suas colônias de origem até as agregações reprodutivas como, por exemplo, os machos de *Tetragonisca angustula* que se deslocam em média, 600 metros (CAPÍTULO 4), contribuindo ainda mais para a representatividade de indivíduos locais.

Por conta da grande variabilidade de machos que formam as agregações reprodutivas em abelhas sem ferrão, representando diferentes colônias locais, possibilita ter uma amostra significativa e rápida de indivíduos que compõem uma determinada população. Muitas ferramentas têm sido utilizadas para identificar grupos taxonômicos ou populações de abelhas sem ferrão sendo que os estudos morfométricos tem sido um dos mais informativos, rápidos e de baixo custo para analisar a diversidade (MENDES *ET*

AL., 2007; FRANCISCO ET AL., 2008; FRANCOY ET AL., 2009; FRANCOY & IMPERATRIZ-FONSECA, 2010; FRANCOY ET AL., 2011; BONATTI, 2012).

A análise morfométrica em abelhas tem sido a longo tempo útil no reconhecimento de padrões e variações entre os indivíduos, como em *Apis mellifera* (RUTTNER, 1978), identificação de gêneros em abelhas sem ferrão (FRANCOY ET AL., 2009) e até uma nova casta (guarda) em *Tetragonisca angustula* (GRÜTER ET AL., 2012). Assim, a tomada de várias medidas corporais das abelhas para posterior análise multivariada dos dados provê informações relevantes que permitem reconhecer/ identificar populações ou táxons com boa acuidade e segurança.

O enfoque morfométrico no estudo com abelhas tem sido sistematicamente aperfeiçoado possibilitando diferenciar, por exemplo, machos e fêmeas de diferentes estações do ano predizendo, assim, possíveis pressões ecológicas agindo sobre as variáveis analisadas (SKANDALIS ET AL., 2009). Até mesmo análises das medidas de tamanhos dos machos em abelhas sociais têm começado a levantar questionamentos sobre o sucesso reprodutivo desses indivíduos dependendo de seu tamanho (BERG ET AL., 1997; COUVILLON ET AL., 2010; AMIN ET AL., 2012; PECH-MAY ET AL., 2012) ou simetria (JAFFÉ & MORITZ, 2010).

Embora boa parte dos trabalhos, acima citados, tenham analisado as abelhas utilizando o enfoque da morfometria geométrica, acreditamos que uma análise morfométrica tradicional seja um bom ponto de partida para começarmos a visualizar os possíveis padrões morfológicos dos machos de abelhas sem ferrão em agregações reprodutivas. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo analisar morfometricamente machos de *Tetragonisca angustula* agregados perto de ninhos em três municípios paulistas: Campinas, São Paulo e Ribeirão Preto. Nossa hipótese é que,

por meio da análise morfométrica, é possível separar os grupos de acordo com a população de origem.

2. Materiais e Métodos

2.1. Locais das amostras

Três municípios do estado de São Paulo foram escolhidos para a amostra de machos de *Tetragonisca angustula*. A primeira amostra foi coletada em uma agregação de machos que estava ocorrendo dentro do Laboratório de Abelhas da Universidade de São Paulo, município de São Paulo, no dia 19/01/2011. A segunda amostra foi feita na cidade de Campinas/ SP em uma agregação acontecendo em uma das colônias transportadas de São Paulo para Campinas e mantidas temporariamente dentro do *campus* da Universidade Estadual de Campinas no dia 07/02/2011. Por fim, a terceira localidade foi no município de Ribeirão Preto/ SP em uma agregação que estava ocorrendo em um ninho-armadilha no *campus* da Universidade de São Paulo (Figura 1).

Figura 1. Municípios paulistas onde foram observadas agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) e amostrados indivíduos para análises morfométricas. Mapa gerado em *ArcGIS 10* (ESRI Inc.) por Andre Luis Acosta.

base da asa à porção final da veia costal. Prancha modificada de Camargo *et al.*, 1967. *Papéis Avulsos de Zoologia* **20**: 229-258

2.3. Análises estatísticas

Tomadas as medidas morfométricas de sete caracteres dos machos de *T. angustula*, foram feitos testes estatísticos multivariados de Análise de Variância Multivariada (MANOVA, *sigla em inglês*), seguida de uma Análise de Componentes Principais (ACP) para reduzir a dimensionalidade das variáveis e analisar aqueles componentes que melhor explicariam as variações nos três grupos de machos estudados.

Posteriormente, foi realizada uma Análise Discriminante (AD), a fim de determinar quais variáveis discriminariam e, assim, seriam as melhores preditoras, para ordenar os três grupos de machos analisados. A distância quadrada de Mahalanobis (D^2) entre as três populações de machos também foi estudada com a finalidade de avaliar quais localidades seriam mais próximas entre si. Todos os testes foram feitos no programa estatístico *Statistica 7*.

3. Resultados

As médias e desvios padrão das sete medidas tomadas dos machos de *T. angustula* em agregações reprodutivas dos três municípios paulistas estudados estão na Tabela 1. A análise de variância multivariada das sete medidas morfométricas dos machos indicam que as três localidades são significativamente diferentes (Wilk's $\lambda = 0.331$; $F = 8.52$; $p = < 0.001$).

A análise de componentes principais revelou que os dois primeiros componentes explicaram 79.6% da variação entre as três agregações. Os dados dessa análise estão na Tabela 2 e a representação gráfica dos dois primeiros componentes responsáveis por explicar as variações do conjunto de dados estão na Figura 3. Observar-se que o

Componente 1 e 2 explicaram, respectivamente, 64.5% e 15.15% das variações dentro da amostra. O comprimento da asa foi o caráter que mais variou entre as agregações (Figura 4).

Tabela 1. Variáveis métricas de sete caracteres morfológicos de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea; Meliponini) coletados em São Paulo (sp), Campinas (cps) e Ribeirão Preto (rp). 30 indivíduos por localidade.

Variáveis	quantidade	local	média	mínimo	máximo	desvio padrão
largura cabeça	30	rp	1.633667	1.540000	1.750000	0.049094
	30	cps	1.626667	1.560000	1.690000	0.036230
	30	sp	1.617667	1.530000	1.700000	0.037202
altura cabeça	30	rp	0.746667	0.690000	0.820000	0.035363
	30	cps	0.764000	0.710000	0.830000	0.026340
	30	sp	0.776667	0.700000	0.840000	0.027080
inter-orbital	30	rp	0.891000	0.800000	0.930000	0.027336
	30	cps	0.897000	0.850000	0.970000	0.029960
	30	sp	0.903000	0.870000	0.940000	0.018411
comprimento tórax	30	rp	1.189000	1.050000	1.270000	0.059035
	30	cps	1.198333	1.050000	1.290000	0.044496
	30	sp	1.215333	1.160000	1.300000	0.035597
inter-tegular	30	rp	1.056333	0.950000	1.140000	0.043588
	30	cps	1.080667	1.010000	1.210000	0.038141
	30	sp	1.076333	1.020000	1.130000	0.031784
comprimento asa	30	rp	2.403667	2.240000	2.520000	0.071220
	30	cps	2.533667	2.360000	2.710000	0.066358
	30	sp	2.480333	2.230000	2.650000	0.084302
largura asa	30	rp	0.965000	0.870000	1.050000	0.040916
	30	cps	0.988000	0.910000	1.060000	0.036897
	30	sp	0.974000	0.880000	1.050000	0.041156

Tabela 2. Autovalores (*eigenvalues*) da matriz de covariância e estatísticas relacionadas. Sete variáveis de caracteres de machos de *Tetragonisca angustula* (Meliponini). Campinas, São Paulo e Ribeirão Preto. *Statistica 7*.

	Autovalores	% Variância	% Acumulativa
1	0.011073	64.50109	64.5011
2	0.002602	15.15991	79.6610
3	0.001213	7.06828	86.7293
4	0.000921	5.36633	92.0956
5	0.000659	3.83722	95.9328
6	0.000389	2.26355	98.1964
7	0.000310	1.80363	100.0000

Figura 3. Autovalores (*eigenvalue*) da matriz de correlação de sete caracteres morfológicos dos machos de *Tetragonisca angustula* (Meliponini) de Campinas, São Paulo e Ribeirão Preto. *ScreePlot*, *Statistica 7*.

Figura 4. Projeção de variáveis em um fator-plano (1x2). Componente 1: 64.%; Componente 2: 15.16% *Statistica 7*.

A ordenação pela análise discriminante dos grupos de machos de *T. angustula* de acordo com a localidade amostrada teve a colaboração, em grande parte, da largura da cabeça e de três medidas relacionadas ao tórax, ou seja, a distância inter-tegular, o comprimento e a largura das asas anteriores (Tabela 3). O valor de Wilks's λ foi de 0.33172 ($F_{(14,162)} = 8.5196$) $p < 0.001$. Valores de λ Wilks próximos de zero representam uma ótima separação dos grupos. Devido o valor de λ Wilks do estudo presente ter sido de 0.33 demonstra que as nossas análises tiveram uma boa eficiência em separar os machos de *T. angustula* das três localidades estudadas. A função discriminante foi capaz de distinguir 90% dos machos de Ribeirão Preto, 70% dos machos de Campinas e 50% dos machos de São Paulo.

A distância quadrada de Mahalanobis demonstra que as agregações de machos de Campinas e São Paulo são mais próximas morfometricamente entre si, embora todas as três localidades sejam significativamente distantes entre si (Tabela 4; Figura 5).

Tabela 3. Resumo da análise de função discriminante de sete variáveis de caracteres de machos de *Tetragonisca angustula* (Meliponini). Campinas, São Paulo e Ribeirão Preto.

	λ Wilks	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
Largura cabeça	0.435600	< 0.001	0.302222	0.697778
Altura cabeça	0.354940	> 0.05	0.784612	0.215388
Distância inter-orbital	0.345634	> 0.05	0.601014	0.398986
Comprimento tórax	0.350624	> 0.05	0.667972	0.332028
Distância inter-tegular	0.360095	< 0.05	0.430903	0.569097
Comprimento asa	0.559448	< 0.001	0.310746	0.689254
Largura asa	0.358712	< 0.05	0.323732	0.676268

Tabela 4. Distância quadrada de Mahalanobis (D^2). Machos de *Tetragonisca angustula* (Meliponini). Ribeirão Preto (rp), Campinas (cps) e São Paulo (sp).

	rp	cps	sp
rp	0.000000		
cps	7.608052*	0.000000	
sp	5.150731*	1.733828*	0.000000

* - diferença significativa ($p < 0.001$)

Figura 5. Variáveis canônicas sobre sete caracteres morfológicos dos machos de *Tetragonisca angustula* (Meliponini) de Ribeirão Preto = azul, Campinas = verde, São Paulo = vermelho. ScatterPlot, Statistica 7.

4. Discussão

4.1. Populações de machos de *Tetragonisca angustula* diferenciados pela morfometria

Nossos dados sobre as diferentes medidas dos machos de *T. angustula* de três municípios paulistas amostrados (São Paulo, Campinas e Ribeirão Preto) demonstram que esses indivíduos apresentam diferenças morfométricas significativas entre si e que possibilitam separá-los com uma boa acuidade de acordo com suas localidades. As populações de machos de *T. angustula* de São Paulo e Campinas, que foram mais

próximas, segundo a distância quadrada de Mahalanobis ($D^2 = 1.73$), são também cidades mais próximas geograficamente entre si, 96 km, do que as duas de Ribeirão Preto, 225 km e 336 km, respectivamente. Porém, não podemos assegurar que variáveis ecológicas ou climáticas e, assim, pressões ecológicas mais comuns entre Campinas e São Paulo tenham influenciado na maior proximidade morfométrica entre elas, embora não possa ser necessariamente descartada.

Um fato interessante é que os machos da população de São Paulo foram coletados dentro do meliponário do Laboratório de Abelhas onde muitas colônias são provenientes de outras localidades adquiridas por compra ou permuta com dos municípios de Ribeirão Preto e Franca, região de Ribeirão Preto. Entretanto, temos uma hipótese para a agregação de São Paulo não ter sido muito próxima à de Ribeirão Preto. A agregação de São Paulo pode ter sido visitada por muitos machos locais de dentro do próprio *campus* da Universidade de São Paulo, em São Paulo. Uma possibilidade bastante alta já que o *campus* possui muitos ninhos naturais (Paulo César Fernandes – com.pes.) e os machos são provenientes de várias colônias de uma determinada localidade (PAXTON, 2000; CAMERON *ET AL.*, 2004; BAUDRY *ET AL.*, 2008; KRAUS *ET AL.*, 2005; MUELLER *ET AL.*, 2012; TRABALHO ATUAL – CAPÍTULO 4) que tendem, inclusive, a se afastarem consideravelmente de seus ninhos de origem (> 600 m) após abandoná-lo definitivamente (Capítulo 4).

Nosso enfoque para avaliarmos populações de machos de *T. angustula* agregados perto de ninhos por meio de análise morfométrica foi bem sucedida em separar os respectivos grupos. Essa técnica é bastante refinada para detectar diferenças significativas entre os indivíduos. Por exemplo, operárias de *Plebeia remota* de duas cidades em diferentes estados (Cunha/ São Paulo e Prudentópolis/ Paraná) puderam ser categoricamente inferidas de acordo com município de origem (FRANCISCO *ET AL.*, 2008).

Em uma escala geográfica menor, operárias de *Nannotrigona testaceicornis* amostradas dentro do município de Uberlândia/ Minas Gerais puderam ser diferenciadas eficientemente de acordo com suas respectivas subpopulações (MENDES ET AL., 2007).

O comprimento e a largura das asas dos machos foram duas, de quatro, variáveis que mais contribuíram para agrupar os indivíduos de acordo com suas populações. Se considerarmos, então, que as asas são bom caráter morfológico para analisar padrões populacionais ou taxonômicos em abelhas sem ferrão (MENDES ET AL., 2007; FRANCOY ET AL. 2008; FRANCISCO ET AL., 2008; FRANCOY ET AL., 2009; FRANCOY & IMPERATRIZ-FONSECA, 2010; FRANCOY ET AL., 2011) e que os machos de abelhas sociais estão sob forte pressão seletiva para demonstrar vigor físico e capacidades de vôo nas agregações (ROUBIK 1990; JAFFÉ & MORTIZ, 2010), a morfometria geométrica das asas dos machos em Meliponini podem ser bem exploradas

4.2. Potenciais estudos com machos de abelhas sem ferrão utilizando morfometria geométrica

A análise morfométrica no estudo da diversidade de abelhas utilizando suas asas tem sido um método eficiente e preciso em identificar ecótipos, populações e grupos taxonômicos (MENDES ET AL., 2007; FRANCOY ET AL. 2008; FRANCISCO ET AL., 2008; FRANCOY ET AL., 2009; FRANCOY ET AL., 2011). Devido à essa eficiência e facilidade na tomada dos dados, a morfometria geométrica pode auxiliar responder outras perguntas biológicas como aquelas de cunho reprodutivo avaliando diferenças de tamanho e simetria entre grupos de indivíduos.

Por exemplo, acreditava-se que os zangões de *Apis mellifera* de tamanho menor tivessem poucas chances reprodutivas nas áreas de congregação ao competir com os machos maiores (BERG ET AL., 1997). Porém, após analisar morfometricamente e em

horários diferentes os machos que visitavam as áreas de congregação, demonstrou-se que os machos menores tendem a adotar uma estratégia reprodutiva diferente, visitando as congregações mais cedo que os machos relativamente maiores (COUVILLON *ET AL.*, 2010). Outra interessante conclusão obtida após analisar-se morfometricamente zangões que deixavam ou não suas colônias para visitarem áreas de congregação foi que diferenças na simetria das asas (assimetria flutuante) desses machos era suficiente para que certos indivíduos (maior assimetria flutuante) não abandonassem suas colônias, afetando assim seu potencial reprodutivo (JAFFÉ & MORITZ, 2010).

Desse modo, embora se saiba que as estratégias reprodutivas dos machos em abelhas sem ferrão também sejam bem estruturadas (MICHENER, 1946; NOGUEIRA-NETO, 1954; NOGUEIRA-FERREIRA & SOARES, 1998, VAN VEEN & SOMMEIJER, 2000A) como aquelas dos machos de abelhas melíferas, será que os indivíduos que compõem as agregações são todos do mesmo tamanho e estão adotando as mesmas estratégias? Se considerarmos que os machos de abelhas sem ferrão podem receber quantidades diferentes de alimento em determinada colônia ou período do ano (PRATO, 2010; PECH-MAY *ET AL.*, 2012), podendo afetar inclusive seu tamanho e sua quantidade de esperma (PECH-MAY *ET AL.*, 2012), talvez futuras análises morfométricas dos machos de Meliponini poderão encontrar mais novidades como as que recentemente proveu com guardas de *T. angustula* (GRÜTER *ET AL.*, 2012).

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A comunicação química entre insetos sociais, como certos grupos de abelhas, por exemplo, é de extrema importância porque esses organismos exibem diversas interações entre si e realizam várias tarefas dentro e fora dos ninhos. Essas interações e tarefas são realizadas essencialmente pelas fêmeas (rainhas e operárias). A interação entre rainhas e operárias é constante e assume gradativamente maior importância à medida que a rainha virgem começa a ficar atrativa e madura sexualmente. Após elas se acasalarem com sucesso e tornarem-se rainhas fisogástricas suas atividades aumentam em complexidade como o processo de oviposição e postura mediado com suas operárias. Acompanhando toda essa aquisição de comportamentos mais complexos no ciclo de vida das rainhas está também a composição de seus perfis químicos (**Capítulos 1 e 2**).

Os primeiros resultados de nossos trabalhos demonstram claramente o papel que a comunicação química possui para essas abelhas. Por exemplo, quando as primeiras rainhas virgens de *Tetragonisca angustula* foram criadas *in vitro* poucos compostos eram observados em seus extratos abdominais e cefálicos. Mas quando foram oferecidas condições sociais de maior interação como trofalaxia com operárias e disputas agressivas com outras rainhas, os perfis químicos começaram a aparecer mais consistentemente e de maneira mais uniforme.

O presente trabalho, ao analisar rainhas virgens atrativas sexualmente de *Tetragonisca angustula* juntamente com as rainhas fisogástricas demonstrou que as fisogástricas possuem também nessa espécie uma composição química mais complexa e rica que as virgens em glândulas abdominais, cefálicas e ceras cuticulares (**Capítulos 1 e 2**). Nas análises químicas da glândula de Dufour e dos extratos cefálicos das rainhas virgens comparadas com as das rainhas fisogástricas é possível verificar a baixa

quantidade de compostos químicos nessas porções corporais. Assim, dos 23 ésteres identificados nas glândulas de Dufour das rainhas, 22 estavam exclusivamente na rainha fisogástrica e apenas um presente nas rainhas virgens, o octadecenoato de octadecila, ausente nas fisogástricas (**Capítulos 1**).

Concordantemente, dos diversos compostos químicos presentes nos extratos cefálicos das rainhas fisogástricas, as rainhas virgens exibiram majoritariamente um, o álcool nerol (92%) (**Capítulos 2**). Por serem dois compostos dominantes nas rainhas virgens, o octadecenoato de octadecila e o nerol despertam interesse para se conhecer qual seria a função biológica desses compostos ou se eles são somente precursores de outros compostos utilizados pelas rainhas virgens antes ou após seu acasalamento.

A mensagem química contida nesses e nos demais compostos identificados em ambos os tipos de rainhas é muito importante para se entender como se dá as interações entre os membros das colônias dentro e fora delas. Como pudemos analisar aparentemente os compostos químicos contidos em grande parte nas glândulas tergaís e de Dufour das rainhas virgens e fisogástricas possuem compostos atrativos para os machos. Esses compostos voláteis são os ésteres hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila, que são liberados pelas duas rainhas quando as mesmas são perturbadas e ficam agitadas. Não sabemos se são esses os compostos emitidos pelas rainhas virgens dias antes de se acasalar atraindo os machos para perto das colônias ou se elas liberam esses compostos durante o vôo nupcial.

O fato é que o hexanoato de isopropila e hexanoato de hexila são atrativos para os machos. Porém, há a possibilidade de outros compostos estarem contribuindo para a atração dos machos ou mesmo estimulando-os sexualmente a copular. Em nossos bioensaios, ficou evidente que após entrar em contato com compostos deixados pelas rainhas nos recipientes que elas haviam sido aprisionadas, os machos disputaram os

substratos com compostos das rainhas e os machos ali presentes podiam ser vigorosamente investigados por outros indivíduos. Ficou demonstrada, assim, que a reprodução em *T. angustula* é mediada por compostos químicos.

Se por um lado pode-se saber com o presente estudo que o perfil químico das rainhas de *T. angustula* muda dependendo de seu status reprodutivo, por outro não se conhecia se havia variação de compostos químicos entre os machos de *T. angustula* que ainda não tinham abandonado seus ninhos e aqueles presentes em agregações reprodutivas. As informações que obtivemos (**Capítulos 3**) informam que, pelo menos para os extratos cefálicos, os machos de dentro e de fora dos ninhos são muito parecidos.

Conhecer sobre a composição química das glândulas dos machos, embora pareça de pouco interesse, já que eles interagem pouco dentro das colônias, pode ser bastante informativo. Por exemplo, quando foi criado o cenário para os machos poderem ser observados e coletados, as arenas entre os ninhos e o ambiente externo, pode-se verificar operárias agredindo alguns machos (**Capítulos 3**). Como os machos que estavam sendo discriminados e agredidos já estavam potencialmente maduros sexualmente, é possível que as operárias reconheçam os odores de tais machos. Porém, é preciso novas análises e experimentos para confirmar essa hipótese e o significado evolutivo desse comportamento.

Outro comportamento bastante observado dentro das arenas foi a desidratação de néctar pelos machos de *T. angustula* poucos dias antes deles abandonarem seus ninhos (**Capítulos 3**). Essa desidratação de néctar parece ser muito importante para a próxima fase do ciclo de vida dos machos fora de seus ninhos. O ciclo de vida dos machos de *T. angustula* fora dos ninhos é caracterizado primariamente pela busca por fêmeas reprodutivas. Quando eles detectam colônias com rainhas virgens ou encontram ninhos

em processo de fundação pelas operárias, vários indivíduos se agregam por vários dias nas proximidades desses ninhos à espera do vôo nupcial das jovens rainhas. Nossos resultados demonstram que, em concordância com estudos feitos com outras espécies de abelha sem ferrão, muitos machos presentes nas agregações reprodutivas são provenientes de diversas colônias da localidade e, em média, percorreram centenas de metros (± 600) de seus ninhos natais até as agregações (**Capítulos 4**). Possivelmente esse deslocamento é feito diariamente a partir do dia em que os machos deixaram seus ninhos. Embora as colônias possam liberar diversos machos em um curto intervalo de tempo (**Capítulos 3**), poucos machos nas agregações são aparentados, ou seja, provenientes dos mesmos ninhos (**Capítulos 4**). Essa característica de dispersão parece ser uma estratégia interessante em potencializar as chances dos genes de determinadas colônias estarem presentes na próxima geração de colônias.

A diversidade genética de uma determinada região pode refletir no fenótipo dos indivíduos daquela população e, assim, as características morfológicas dos indivíduos podem ser caracteres informativos na identificação de grupos de indivíduos de localidades específicas. No presente estudo, pudemos verificar que com poucos caracteres analisados morfometricamente e com uma população amostral pouco numerosa foi possível separar grupos de machos de acordo com as localidades estudadas – Campinas, São Paulo e Ribeirão Preto (**Capítulos 5**).

As conclusões geradas em cada um dos cinco capítulos desta tese e discutidas sucintamente nesta seção respondem a muitas perguntas sobre comunicação química entre machos e rainhas, diversidade genética de agregações reprodutivas e diferenciação morfológica entre populações de machos de *T. angustula*. Todo esse conhecimento gerado não poderia ter sido eficientemente coletado e analisado se duas importantes técnicas não tivessem sido aplicadas, ou seja, a criação *in vitro* de rainhas e a

disponibilização de ninhos-armadilha. A primeira, que inovou ao estimular fisiologicamente as rainhas para tornarem-se atrativas sexualmente, foi muito importante ao prover quantidades adequadas de indivíduos para análise química. A segunda técnica, utilizando ninhos-armadilha, foi essencial para aumentar as chances de registrar e analisar grupos de machos que se agregavam nas proximidades para fins reprodutivos. Portanto, essas técnicas devem ser mais utilizadas e aperfeiçoadas em estudos futuros porque elas otimizam a tomada de dados de eventos ou organismos difíceis de ocorrerem naturalmente.

RESUMO GERAL

As abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Meliponini) possuem um sistema sexual haplodiplóide com determinação sexual complementar em um único locus. Tal sistema é uma grande carga genética para o grupo e, assim, a diversidade genética de machos que se agregam nas proximidades dos ninhos é essencial para minimizar as chances de endogamia. As interações entre os indivíduos da colônia nas abelhas sem ferrão são diversas e grande parte delas é mediada por compostos químicos. A comunicação química é maior entre as rainhas e suas operárias, mas compostos químicos também são importantes para o acasalamento das rainhas. Como muitos machos se agregam nos eventos reprodutivos, é possível coletar e obter uma boa representatividade local de indivíduos e assim analisar certos caracteres que estruturam essas populações. Desse modo, o presente estudo teve como objetivos: (1) analisar quimicamente rainhas virgens e fisogástricas de *Tetragonisca angustula*; (2) analisar o perfil químico de machos dentro e fora dos ninhos; (3) analisar a diversidade genética das agregações de machos, quantas colônias contribuem com machos para formar essas agregações e avaliar qual o parentesco entre agregações de machos e rainhas dos ninhos onde havia agregações; (4) avaliar o potencial de dispersão dos machos de seus ninhos de origem até as agregações; (5) analisar morfometricamente machos compondo agregações de diferentes localidades. Técnicas de criação *in vitro* de rainhas virgens e instalação de ninhos-armadilha foram utilizadas a fim de otimizar a coleta de indivíduos. Nossos resultados indicam que rainhas virgens e rainhas fisogástricas são quimicamente distintas. Embora ambas possuam compostos voláteis atrativos sexualmente para os machos, as rainhas virgens possuem exclusivamente octadecenoato de octadecila e nerol em suas glândulas de Dufour e extratos cefálicos, respectivamente. Os machos que vivem dentro e os que vivem fora dos ninhos são semelhantes quimicamente, possuindo diversos ácidos carboxílicos em seus extratos cefálicos. Cinco agregações, contando com 376 machos, foram analisadas geneticamente sendo os machos provenientes de 83 colônias. Em média, eles se deslocaram ± 612 metros de seus ninhos de origem até as agregações. Essas agregações são muito semelhantes geneticamente entre si, não formando unidades distintas. Somente 3.45% dos machos das agregações eram aparentados às rainhas, o que diminui a probabilidade de inbreeding. Por fim, populações de machos de três localidades distintas puderam ser separadas com boa acuidade de acordo os dados morfométricos. Concluimos que existe comunicação química mediando a interação macho-rainha. A quantidade de colônias em uma determinada área contribui para a grande quantidade de indivíduos e para a diversidade genética das agregações. Os indivíduos nessas agregações são pouco aparentados e podem vir de colônias geograficamente muito distantes. A morfometria é útil em agrupar os machos de diferentes localidades.

ABSTRACT

The stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) present a haplodiploid sex determination system with complementary sex determination in a single locus. Such a system is a large genetic load for the group and thus the genetic diversity of male's aggregations near the nests is essential to minimize the chances of inbreeding. The interactions among the stingless bees nestmates are diverse and chemical compounds mediate most. The chemical communication is higher among the queens and their workers, but chemicals are also important for mating of queens. As the amount of males that aggregate near the nests with gynes is very large, these events allow us to collect and evaluate a local representation of males and thus to analyze certain characters that structure these populations. Thus, this study aimed to: (1) chemically analyzing virgin and physogastric queens of *Tetragonisca angustula*, (2) analyze the chemical profile of males inside and outside their nests, (3) analyze the genetic diversity of the aggregations of males, how many colonies contribute with males to these aggregations and to assess the relatedness between queens and males, (4) evaluate the potential dispersion of males from their nests to aggregations, (5) analyze morphometrically males composing aggregates of different locations. Techniques for rearing virgin queens *in vitro* and installation of trap-nests were used to optimize the sampling of individuals. Our results indicate that virgin queens and physogastric queens are chemically distinct. Although both present volatile compounds sexually attractive to males, virgin queens have exclusively nerol and ethyl octadecenoate in their cephalic extracts and Dufour's glands, respectively. Males from both types (living inside and outside their nests) are chemically similar, possessing several carboxylic acids in their cephalic extracts. About 83 colonies contributed for five aggregations with 376 males. On average, they moved ± 612 meters from their nest of origin to aggregations. These aggregations are genetically very similar to each other, without forming discrete units. Only 3.45% of the males are related to queens. Finally, populations of males of three different locations could be morphometrically separated with good accuracy. We conclude that there is chemical communication mediating the interaction male-queen. The number of colonies in one area contributes to the large number of individuals and the genetic diversity of the aggregations. Individuals in these aggregations are not related and can originate from distant colonies. The morphometry is useful to group the males from different localities.

Referências Bibliográficas

- ABDALLA, F. C., VELTHUIS, H. W. W., DUCHATEAU, M. J., CRUZ-LANDIM, C. 1999. Secretory cycle of the Dufour's gland in workers of bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Bombini). *Netherlands Journal of Zoology* **49**: 139–156.
- ABDALLA, F. C.; JONES, G. R.; MORGAN, E. D. ; CRUZ-LANDIM, C. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genetics and Molecular Research* **2**: 191-199.
- ABDALLA, F. C., JONES, G. R., MORGAN, D., CRUZ-LANDIM, C. 2004. Chemical composition of the Dufour gland secretion in queens of *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **15**: 621–625.
- ABDALLA, F. C., CRUZ-LANDIM, C., GRACIOLI, L. 2005. Tegumentary epithelial glands in the abdomen of virgin and physogastric queens of the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille (Meliponini: Trigonina). *Neotropical Entomology* **34**: 41–45.
- ABDALLA, F. C. 2006. Morphological, chemical and developmental aspects of the Dufour gland in some eusocial bees (Hymenoptera, Apidae): a review. *Revista Brasileira de Entomologia* **50**: 153–162.
- ALCOCK, J.; EICKWORT, G. C.; EICKWORT, K. R. 1977a. The reproductive behavior of *Anthidium maculosum* (Hymenoptera: Megachilidae) and the evolutionary significance of multiple copulations by females. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **2**: 385-396.
- ALCOCK, J.; EUGENE JONES, C.; BUCHMANN, S. L. 1977b. Male mating strategies in the bee *Centris pallida* Fox (Anthophoridae: Hymenoptera). *The American Naturalist* **111**: 145-155
- ALCOCK, J.; BARROWS, E. M.; GORDH, G.; HUBBARD, L. J.; KIRKENDALL, L.; PYLE, D. W.; PONDER, T. L.; ZALOM, K. G. 1978. The ecology and evolution of male reproductive behaviour in the bees and wasps. *Zoological Journal of the Linnean Society* **64**: 293-326.
- ALCOCK, J.; BAILEY, W. J.; SIMMONS, L. W. 2010. The mating system of *Amegilla (Asarapoda) paracalva* Brooks (hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior* **23**: 69-79.
- ALVES, D. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; FRANCOY, T. M.; SANTOS-FILHO, P. S.; BILLEN, J.; WENSELEERS, T. 2011. Successful maintenance of a stingless bee population despite a severe genetic bottleneck. *Conservation Genetics* **12**: 647-658.
- AMIN, M. R.; BUSSIÈRE, L. F. ; GOULSON, D. 2012. Effects of male age and size on mating success in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Behaviour* **25**: 362-374.
- APSEGAITE, V.; SKIRKEVICIUS, A. 1995. Quantitative and qualitative composition of extracts from virgin and mated honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Pheromones* **5**: 23-36.
- ARAÚJO, E. D.; COSTA, M.; CHAUD-NETTO, J.; FOWLER, H. G. 2004. Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. *Brazilian Journal of Biology* **64**: 563-568.
- ARIAS, M. C.; BRITO, R. M.; FRANCISCO, F. O.; MORETTO, G.; OLIVEIRA, F.

- F.; SILVESTRE, D.; SHEPPARD, W. S. 2006. Molecular markers as a tool population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie* **37**: 259-274.
- AYASSE, M. AND PAXTON, R. J., TENGO, J. 2001. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **46**: 31–78.
- BAER, B. 2003. Bumblebees as model organism to study male sexual selection in social insects. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **54**: 521-533.
- BARROWS, E. M. 1983. Male territoriality in the carpenter bee *Xylocopa virginica virginica*. *Animal Behavior* **31**: 806-813.
- BAUDRY, E.; SOLIGNAC, M.; GARNERY, L.; GRIES, M.; CORNUET, J.; KOENIGER, N. 1998. Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proceedings of the Royal Society London B* **265**: 2009-2014.
- BEGO, L. R. 1982. On social regulation in *Nannotrigona* (*Scaptotrigona*) *postica* Latreille, with special reference to male production cycles (Hym., Apidae, Meliponinae). *Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo* **7**: 181-196.
- BEIG, D. 1972. The production of males in queenright colonies of *Trigona* (*Scaptotrigona*) *postica*. *Journal of Apicultural Research* **11**: 33-39.
- BERG, S.; KOENIGER, N.; KOENIGER, G.; FUCHS, S. 1997. Body size and reproductive success of drones (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **28**: 449-460.
- BERTSCH, A. 1984. Foraging in male bumblebees (*Bombus lucorum* L.): maximizing energy or minimizing water load? *Oecologia* **62**: 325-336.
- BILLEN, J. 2006. Signal variety and communication in social insects. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* **17**: 9-25.
- BLUM, M. S.; CREWE, R. M.; KERR, W. E.; KEITH, L. H.; GARRISON, A.W.; WALKER, M. M. 1970. Citral in stingless bees: isolation and functions in trail-laying and robbing. *Journal of Insect Physiology* **16**: 1637–1648.
- BLUM, M. S. AND BLAND, J. M. 1972. Social insect pheromones: their chemistry and function. *American Zoologist* **12**: 553–576.
- BLUM, M.S. 1974. Pheromonal sociality in the Hymenoptera. In: BIRCH, M. C. (Ed.) Pheromones. North-Holland Publishing Company & American Elsevier Company, London, New York. 495p.
- BONATTI, V. 2012. Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro. Dissertação de Mestrado (Genética). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 96pp.
- BRITO, R. M.; FRANCISCO, F. O.; DOMINGUES-YAMADA, A. M. T.; GONÇALVES, P. H. P.; POKER, F. C.; SOARES, A. E. E.; ARIAS, M. C. 2009. Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Conservation Genetics Resources* **1**: 183-187.
- BROWN, B.V. 1997. Parasitic phorid flies: a previously unrecognized cost to aggregation behavior of male stingless bees. *Biotropica* **29**: 370-372.
- BUTLER, C. G. AND FAIREY, E. M. 1964. Pheromones of the honeybee: biological studies of the mandibular gland secretion on the queen. *Journal of Apicultural Research* **3**: 65–76.
- BUTLER, C. G. 1971. The mating behaviour of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Entomology* **46**: 1–11.
- CAMARGO, C. A. 1972a. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia* **32**: 133-141.
- _____. 1972b. Mating of the social bee *Melipona quadrifasciata* under

- controlled conditions (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **45**: 520-523.
- _____. 1972c. Produção “in vitro” de intercastas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). In: Homenagem a W. E. Kerr, Rio Claro-SP, Brasil, p. 37-45.
- _____. 1979. Sex determination in bees. XI. Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata* (Hym., Apidae). *Journal of the Apiculture Research* **18**: 77-84.
- _____. 1982. Longevity of diploid males, haploid males and workers of the social bees *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **55**: 8-12.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. 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. 2008. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region – versão online. Disponível em <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Accessed Jun/24/2012.
- CAMERON, E. C.; FRANCK, P.; OLDROYD, B. P. 2004. Genetic structure of nest aggregations and drone congregations of the southeast Asian stingless bee *Trigona collina*. *Molecular Ecology* **13**: 2357-2364.
- CAMPOS, L. A. O. AND MELO, G. A. R. 1990. Physogastric-queen mating in *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). *Brazilian Journal of Genetics* **13**: 491–500.
- COLLET, T.; CRISTINO, A. S.; QUIROGA, C. F. P.; SOARES, A. E. E. ; DEL LAMA, M. A. 2009. Genetic structure of drone congregation areas of Africanized honeybees in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **32**: 857-863.
- CONNOP, S.; HILL, T.; STEER, J.; SHAW, P. 2011. Microsatellite analysis reveals the spatial dynamics of *Bombus humilis* and *bombus sylvarum*. *Insect Conservation and Diversity* **4**: 212-221.
- CONAMA – CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE: Resolução 346. 2004. Ministério do Meio Ambiente, Brasil. 235-236.
- COOK, J. M.; CROZIER, R. H. 1995. Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *Trends in Ecology and Evolution* **10**: 281-286.
- COPPÉE, A.; MATHY, T.; CAMMAERTS, M-C.; VERHEGGEN, F. J.; TERZO, M.; ISERBYT, S.; VALTEROVA, I.; RASMONT, P. 2011. Age-dependent attractivity of male’s sexual pheromones in *Bombus terrestris* (L.) [Hymenoptera, Apidae]. *Chemoecology* **21**: 75-82.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. 1979. Observações sobre atividades de machos de *Plebeia droryana* (Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Entomologia* **23**: 177-191.
- _____. 2007. Drone congregations in Meliponini: What do they tell us? *Bioscience Journal* **23**: 153–160.
- COUVILLON, M. J.; HUGHES, W. O. H.; PEREZ-SATO, J. A.; MARTIN, S. J.; ROY, G. G. F.; RATNIEKS, F. L. W. 2010. Sexual selection in honey bees: colony variation and the importance of size in male mating success. *Behavioral Ecology* **21**: 520-525.
- CRUZ-LANDIM, C., HOFLING, M. C. A., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1980. Tergal and mandibular glands in queens of *Paratrigona subnuda* (Moure)

- (Hymenoptera: Apidae). Morphology and associated behaviour. *Naturalia* **5**: 121–133.
- CRUZ-LANDIM, C., ABDALLA, F. C., GRACIOLI-VITTI, L. F. 2005. Morphological and functional aspects of volatile-producing glands in bees (Hymenoptera: Apidae). *Insect Science* **12**: 467–480.
- _____. 2006. Class III glands in the abdomen of Meliponini. *Apidologie* **37**: 164 – 174.
- DARCHEN, R. 1977. L'essaimage chez les *Hypotrigona* au Gabon – Dynamique de quelques populations. *Apidologie* **8**: 33-59.
- DARVILL, B.; KNIGHT, M. E.; GOULSON, D. 2004. Use of genetics markers to quantify bumblebee foraging range and nest density. *Oikos* **107**: 471-478.
- DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. 2003. Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* **3**: 167-169.
- DRESSLER, R. L. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **13**: 373-394.
- EARL, D. A. ; VONHOLDT, B. M. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359-361.
- EICKWORT, G.C. 1977. Male territorial behaviour in the mason bee *Hoplitis anthocopoides* (Hymenoptera: Megachilidae). *Animal Behavior* **25**: 542-554.
- EICKWORT, G. C.; GINSBERG, H. S. 1980. Foraging and mating behavior in Apoidea. *Annual Review of Entomology* **25**: 421-446.
- ELTZ, T.; SAGER, A.; LUNAU, K. 2005. Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. *Journal of Comparative Physiology (A)* **191**: 575-581.
- ENGELS, E.; ENGELS, W. 1984. Drohnen-ansammlungen bei nestern der stachellosen biene *Scaptotrigona postica*. *Apidologie* **15**: 315-328.
- ENGELS, W. 1986. The concept of chemical communication in arthropods as realized in social bee reproduction. *Advanced Invertebrate Reproduction* **4**: 285-296.
- ENGELS, W. 1987. Pheromones and reproduction in Brazilian stingless bees. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **82**: 35–45.
- ENGELS, E.; ENGELS, W. 1987. Age dependent queen attractiveness for drones and mating in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Journal of Apicultural Research* **27**: 3–8.
- ENGELS, W.; ENGELS, E.; LUBKE, G.; SCHRODER, W.; FRANCKE, W. 1990. Volatile cephalic secretions of drones, queens and workers in relation to reproduction in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) *Entomologia Generalis* **15**: 91-101.
- ENGELS, W.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. IN ENGELS, W. Social insects. An evolutionary approach to castes and reproduction. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 167-230.
- ENGELS, W.; ENGELS, E.; LUBKE, G.; SCHRODER, 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.
- ENGELS, W., ENGELS E., FRANCKE, W. 1997. Ontogeny of cefalic volatile patterns in queens and mating biology of the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Invertebrates Reproductive and Development* **30**: 251–256.

- ENGELS, W.; ROSENKRANZ, P.; ADLER, A.; TAGHIZADEH, T.; LUBKE, G.; FRANCKE, W. 1997. Mandibular glands volatiles and their ontogenetic patterns in queens honey bees, *Apis mellifera carnica*. *Journal of Insect Physiology* **43**: 307-313.
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J-M. 1994. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society London B* **258**: 1-7.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620.
- FLACH, A., MARSAIOLI, A. J., SINGER, R. B., AMARAL, M. C. E., MENEZES, C., KERR, W. E., BATISTA-PEREIRA, L. G., CORRÊA, A. G. 2006. Pollination by sexual mimicry in *Mormolyca ringens*: a floral chemistry that remarkably matches the pheromones of virgin queens of *Scaptotrigona* sp.. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 59-70.
- FERNANDES, A.; DUFFIELD, R. M.; WHEELER, J. W.; LABERGE, W. E. 1981. Chemistry of the Dufour's gland secretion of North American andrenid bees (Hymenoptera: Andrenidae). *Journal of Chemical Ecology* **7**: 453-463.
- FERNANDES, C. R. M.; MARTINS, C. F.; FERREIRA, K. M.; DEL LAMA, M. A. 2012. Gene variation, population differentiation, and sociogenetic structure of nest of *Partamona seridoensis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Biochemical Genetics* **50**: 325-335.
- FERREIRA-CALIMAN, M. J.; NASCIMENTO, F. S.; TURATTI, I. C.; MATEUS, S.; LOPES, N. P.; ZUCCHI, R. 2010. The cuticular hydrocarbons profiles in the stingless bee *Melipona marginata* reflect task-related differences. *Journal of Insect Physiology* **56**: 800-804.
- FIERRO, M. M., CRUZ-LÓPEZ, L., SÁNCHEZ, D., VILLANUEVA-GUTIÉRREZ, R., VANDAME, R. 2011. Queen volatiles as a modulator of *Tetragonisca angustula* drone behavior. *Journal of Chemical Ecology* **37**: 1255-1262.
- FOSTER, R. L. 1992. Nestmate recognition as an inbreeding avoidance mechanism in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **65**: 238-243.
- FRANCISCO, F. O.; BRITO, R. M.; ARIAS, M. C. 2006. Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Neotropical Entomology* **35**: 638-643.
- FRANCISCO, F. O.; NUNES-SILVA, P.; FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ARIAS, M. C.; MORGAN, E. D. 2006. Morphometrical, biochemical and molecular tools for assessing biodiversity. Na example in *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux* **55**: 231-237.
- FRANCKE, W.; LUBKE, G.; SCHRODER, W.; RECKZIEGEL, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT, A.; ENGELS, E.; RADTKE, R.; ENGELS, W. 2000. Identification of oxygen containing volatiles in cephalic secretions of workers of Brazilian stingless bees. *Journal of Brazilian Chemical Society* **11**: 562-571.
- FRANCOY, T. M.; WITTMANN, D.; DRAUSCHKE, M.; MULLER, S.; STEINAHGE, V.; BEZARRA-LAURE, M. A. F.; DE JONG, D.; GONÇALVES, L. S. 2008. Identification of Africanized honey bees through wing morphometrics: two fast and efficient procedures. *Apidologie* **39**: 488-494.

- FRANCOY, T. M.; SILVA, R. A. O.; NUNES-SILVA, P. MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2009. Gender identification of Five genera of stingless bees (Apidae, Meliponinae) based on wing morphology. *Genetics and Molecular Research* **8**: 207-214.
- FRANCOY, T. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2010. A morfologia geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas. *Oecologia Australis* **14**: 317-321.
- FRANCOY, T. M.; GRASSI, M. L.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MAY-YTZÁ, W. J.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G.; 2011. Geometric morphometrics of the wings as a tool for assigning genetics lineages and geographic origin to *Melipona beecheii* (Hymenoptera: Meliponini). *Apidologie* **42**: 499-507.
- GARY, N. E. 1962. Chemical mating attractants in the Queen honey bee. *Science* **136**: 773-774.
- GOODNIGHT, K. F.; QUELLER, D. C. 1999. Computer software for performing likelihood test of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology* **8**: 1231-1234.
- GRAJALES-CONESA, J., ROJAS, J. C., GUZMÁN-DÍAZ, M., RINCÓN-RABANALES, M., CRUZ-LÓPEZ, L. 2007. Cephalic and Dufour gland secretions of *Scaptotrigona mexicana* queens: chemical composition and biological activity. *Apidologie* **38**: 38-46.
- GREEN, C. L.; OLDROYD, B. P. 2002. Queen mating frequency and maternity of males in the stingless bee *Trigona carbonaria* Smith. *Insectes Sociaux* **49**: 196-202.
- GROSSO, A. F.; BEGO, L. R.; MARTINEZ, A. S. 2000. The production of males in queenright colonies of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Meliponinae). *Sociobiology* **35**: 475-485.
- GRÜTER, C.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; RATNIEKS, F. L. W. 2012. A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **24**: 1182-1186.
- HEIMPEL G. E.; BOER, J. G. 2008. Sex determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **53**: 209-230.
- HUBISZ, M. J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1322-1332.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1973. Miscellaneous observations on the behaviour of *Schwarziana quadripunctata* (Hym., Apidae, Meliponinae). *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha* **30**: 633-640.
- _____. 1977. Studies on *Paratrigona subnuda* (Moure) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) – II. Behaviour of the virgin Queen. *Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo* **2**: 169-182.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ZUCCHI, R. 1995. Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. *Apidologie* **26**: 231-244.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; MATOS, E. T. FERREIRA, F.; VELTHUIS, H. H. W. 1998. A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). *Insectes Sociaux* **45**: 231-233.
- INOUE, T.; SAKAGAMI, S. F.; SALMAH, S.; YAMANE, S. 1984. The process of colony multiplication in the Sumatran stingless bee *Trigona* (*Tetragonula*) *laeviceps*. *Biotropica* **16**: 110-111.
- JAFFÉ, R.; DIETEMANN, V.; CREWE, R. M.; MORITZ, R. F. A. 2009. Temporal

- variation in the genetic structure of a drone congregation area: an insight into the population dynamics of wild African honeybees (*Apis mellifera scutellata*). *Molecular Ecology* **18**: 1511-1522.
- JAFFÉ, R.; MORITZ, R. F. A. 2010. Mating flight select for symmetry in honeybee drones (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* **97**: 337-343.
- JOHNSON, L. K.; WIEMER, D. F. 1982. Nerol: a alarm substance of the stingless bee, *Trigona fulviventris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Chemical Ecology* **8**:1167-1181.
- KÄRCHER, M. H; RATNIEKS, F. L. W. 2009. Standing and hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* complement each other in entrance guarding and intruder recognition. *Journal of the Apicultural Research* **48**: 209-214.
- KATZAV-GOZANSKY, T.; SOROKER, V.; HAFETZ, A.; COJOCARU, M.; ERDMANN, D. H.; FRANCKE, W. 1997. Plasticity of caste-specific Dufour's gland secretion in the honey bee (*Apis mellifera* L.) *Naturwissenschaften* **84**: 238-241.
- KELLER, L.; NONACS, P. 1993. The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal? *Animal Behaviour* **45**: 787-794.
- KERR, W. E.; KRAUSE, W. 1950. Contribuição para o conhecimento da bionomia dos Meliponini. Fecundação da rainha em *Melipona quadrifasciata* Lep. *Dusenía* **1**: 275-282.
- KERR, W. E., ZUCCHI, R., NAKADAIRA J. T., BUTOLO, J. E. 1962. Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of New York Entomology Society* **70**: 265-276.
- KERR, W. E. 1990. Why are workers in social Hymenoptera not males? *Brazilian Journal of Genetics* **13**: 133-136.
- KERR, W. E., JUNGNIKKEL, H., MORGAN, D. E. 2004. Workers of the stingless bee *Melipona scutellaris* are more similar to males than to queens in their cuticular compounds. *Apidologie* **35**: 611-618.
- KINGHORN, B.; KINGHORN, S. 2010. Pedigree Viewer. Disponível em <http://www-personal.une.edu.au/~bkinghor/pedigree.htm>
- KIMSEY, L. S. 1980. The behaviour of male orchid bees (Apidae, Hymenoptera, Insecta) and the question of leks. *Animal Behaviour* **28**: 996-1004.
- KOEDAM, D.; VELTHAUSZ, P. H.; KRIFT, T. v. d.; DOHMEN, M. R.; SOMMEJEIR, M. J. 1996. Morphology of reproductive and trophic eggs and their controlled release by workers in *Trigona (Tetragonisca) angustula* Illiger (Apidae, Meliponinae). *Physiological Entomology* **21**: 289-296.
- KOEDAM, D. 1999. Production on queens, workers and males in the stingless bees *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae): Patterns in time an space. *Netherlands Journal of Zoology* **49**: 289-302.
- KOEDAM, D.; SLAA, E. J.; BIESMEIJER, J. C.; NOGUEIRA-NETO, P. 2009. Unsuccessful attacks dominate a drone-preying wasp's hunting performance near stingless bee nests. *Genetics and molecular Research* **8**: 690-702.
- KOEDAM, D.; MORGAN, E. D.; NUNES, T. M.; PATRÍCIO, E. F. L. R. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2011. Selective preying of the sphecoid wasp *Trachypus boharti* on the meliponine bee *Scaptotrigona postica*: potential involvement of caste-specific cuticular hydrocarbons. *Physiological Entomology* **36**: 187-193.
- KOENIGER, N.; KOENIGER, G.; TINGEK, S.; KALITU, A.; MARDAN, M. 1994.

- Drones of *Apis dorsata* (Fabricius 1793) congregate under the canopy of tall emergent trees in Borneo. *Apidologie* **25**: 249-264.
- KOENIGER, G. 2005. The neglected gender – males in bees. (Editorial). *Apidologie* **36**: 143-144.
- KOENIGER, N.; KOENIGER, G.; GRIES, M.; TINGEK, S. 2005a. Drone competition at drone congregation areas in four *Apis* species. *Apidologie* **36**: 211-221.
- KOENIGER, N.; KOENIGER, G.; PECHHAKER, H. 2005b. The nearer the better? Drones (*Apis mellifera*) prefer nearer drone congregation areas. *Insectes Sociaux* **52**: 31-35.
- KONOVALOV, D. A.; MANNING, C.; HENSHAW, M. T. 2004. Kingroup: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes* **4**: 779-782.
- KRAUS, F. B.; KOENIGER, N.; TINGEK, S.; MORITZ, R. F. A. 2005. Temporal genetic structure of a drone congregation area of the giant Asian honeybee (*Apis dorsata*). *Naturwissenschaften* **92**: 578-581.
- KRAUS, F. B.; WEINHOLD, S.; MORITZ, R. F. A. 2008. Genetic structure of drone congregations of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Insectes Sociaux* **55**: 22-27.
- KRAUS, F. B.; WOLF, S.; MORITZ, R. F. A. 2009. Male flight distance and population substructure in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Journal of Animal Ecology* **78**: 247-252.
- KRIEGER, G. M.; DUCHATEAU, M.-J.; VAN DOORN, A.; IBARRA, F.; FRANCKE, W.; AYASSE, M. 2006. Identification of queen sex pheromone components of the bumblebee *Bombus terrestris*. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 453-471.
- LENSKY, Y.; CASSIER, P.; NOTKIN, M. DELORME-JOULIE, C.; LEVINSOHN, M. 1985. Pheromonal activity and fine structure of the mandibular glands of honeybee drones (*Apis mellifera* L.) (Insecta, Hymenoptera, Apidae). *Journal of Insect Physiology* **31**: 265-276.
- LEYS, R.; HOGERNDOORN, K. 2008. Correlated evolution of mating behaviour and morphology in large carpenter bees (*Xylocopa*). *Apidologie* **39**: 119-132.
- LOPEZ, J. C. G.; KRAUS, F. B. 2009. Cherchez la femme? Site choice of drone congregations in the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Animal Behaviour* **77**: 1247-1252.
- MEDEIROS, P. C. R.; SCHLINDWEIN, C. 2003. Territórios de machos, acasalamento, distribuição e relação com plantas em *Protomelitura turnerae* (Ducke, 1907) (Hymenoptera, Andrenidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **47**: 589-596.
- MENDES, M. F. M.; FRANCOY, T. M.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2007. Intra-populational variability of *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) using relative warp analysis. *Bioscience Journal* **23**: 147-152.
- MENEZES, C. 2010. A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado (Entomologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- MICHENER, C. D. 1946. Notes on the habits of some Panamanian stingless bees (Hymenoptera, Apidae). *Journal of New York Entomology Society* **54**: 179-197.
- MICHENER, C. D. 1974. The Social Behavior of the Bees. Cambridge: Harvard University Press, 404pp.
- MICHENER, C. D. 2007. The bees of the world. 2a edição. The Johns Hopkins University Press, EUA.

- MUELLER, M. Y.; MORITZ, R. F. A.; KRAUS, F. B. 2012. Outbreeding and lack of temporal genetic structure in a drone congregation of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Ecology and Evolution*. doi: 10.1002/ece3.203.
- NAVES DA SILVA, D. L.; ZUCCHI, R.; KERR, W. E. 1972. Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Animal Behaviour* **20**: 123-132.
- NOGUEIRA-FERREIRA, F. H.; SOARES, A. E. E. 1998. Male aggregations and mating flight in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Iheringia, Série Zoologia* **84**: 141-144.
- NOGUEIRA-FERREIRA, F. H.; SILVA-MATOS, E. V.; ZUCCHI, R. 2009. Interaction and behavior of virgin and physogastric queens in three Meliponini species (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Research* **8**: 703-708.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1954. Notas bionômicas sobre meliponíneos III – sobre a enxameagem. *Arquivos do Museu Nacional* **42**: 419-452.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1997. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo, Nogueirapis, 445pp.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1957. Pesquisas em andamento. *Chácaras e Quintais* **96**: 880.
- NUNES, T. M.; TURATTI, I.; MATEUS, S.; NASCIMENTO, F. S.; LOPES, N. P.; ZUCCHI, R. 2008. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hym., Apidae, Meliponinae): differences between colonies, castes and age. *Genetics and Molecular Research: v. espec.* 01-12.
- NUNES, T. M.; TURATTI, I. C. C.; LOPES, N. P.; ZUCCHI, R. 2009. Chemical signals in the stingless bee, *Friesiella varia*, indicate caste, gender, age, and reproductive status. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 1172-1180.
- NUNES, T. M.; MORGAN, D. E.; FALKO, D. P.; ZUCCHI, R. 2010. Caste-specific cuticular lipids in the stingless bee. *Apidologie* **41**: 579-588.
- OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, C.; SILVA, R. A. O.; SOARES, A. E. E.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2009. Como obter enxames de abelhas sem ferrão na natureza? *Mensagem Doce* **100**: 1-6.
- OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, C.; SOARES, A. E. E.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2012. Trap-nests for stingless bees (Hymenoptera, Meliponini). *Apidologie*: DOI 10.1007/s13592-012-0152-y
- OLIVEIRA, R.; SCHLINDWEIN, C. 2010. Experimental demonstration of alternative mating tactics of male *Ptilothrix fructifera* (Hymenoptera, Apidae). *Animal Behaviour* **80**: 241-247.
- PAIN, J.; RUTTNER, M. F. 1963. Les extraits de glandes mandibulaires des reines d'Abeille attirent les mâles, lors du vol nuptial. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* **256**: 512-515.
- PAIN, J.; BARBIER, M. 1963. Structures chimiques et propriétés biologiques de quelques substances identifiées chez l'Abeille. *Insectes Sociaux* **10**: 129-142.
- PAXTON, R. J. 2000. Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. *Insectes Sociaux* **47**: 63-69.
- PAXTON, R. J.; BEGO, L. R.; SHAH, M. M.; MATEUS, S. 2003. Low mating frequency of queens in the stingless bee *Scaptotrigona postica* and worker maternity of males. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **53**: 174-181.
- PAXTON, R. J. 2005. Male mating behaviour and mating systems of bees: an overview. *Apidologie* **36**: 145-156.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population

- genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288-295.
- PEACH-MAY, F. G.; MEDINA-MEDINA, L.; MAY-YTZÁ, W.; PAXTON, R. J. QUEZADA-EUÁN, J. J. G. 2012. Colony pollen reserves affect body size, sperm production and sexual development in males of the stingless bee *Melipona beecheii*. *Insectes Sociaux*: DOI 10.1007/s00040-012-0236-8.
- PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W., STRASSMANN, J. E. 1999. Mate number, kin selection, and social conflicts in stingless bees and honey bees. *Proceedings of the Royal Society London B* **266**: 379-384.
- PIANARO, A.; MENEZES, C.; KERR, W. E.; SINGER, R. B.; PATRÍCIO, E. F. L. R. A.; MARSAIOLI, A. J. 2009. Stingless bees: chemical differences and potencial functions in *Nannotrigona testaceicornis* and *Plebeia droryana* males and workers. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 1117-1128.
- PIOKER-HARA, F. C. 2011. Determinantes da densidade e distribuição de ninhos e diversidade de espécies de meliponíneos (Apidae, Melionini) em áreas de cerrado de Itirapina, SP. Tese (Doutorado), Departamento de Ecologia – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 232pp.
- PRATO, M. 2010. Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Dissertação de Mestrado (Entomologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 114 pp.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* **43**: 258-275.
- QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution* **8**: 285-288.
- QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E. 1998. Kin selection and social insects. Social insects provide the most surprising predictions and satisfying tests of kin selection. *BioScience* **48**: 165-175.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity* **86**: 248-249.
- ROUBIK, D. W. 1990. Mate location and mate competition in males of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). *Entomologia Generalis* **15**: 115-120.
- RUTTNER, F. 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* **9**: 363-381.
- SAKAGAMI, S. F.; LAROCA, S. 1963. Additional observations on the habits of the cleptobiotic stingless bees, the genus *Lestrimelitta* Friese (Hymenoptera, Apoidea). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University. Serie Zoology* **15**: 319-339.
- SAKAGAMI, S. F. 1982. Stingless bees. HERMANN, H. R. (ed.) Social Insects III. New York: Academic Press, 361-423.
- SCHWARZ, H. F. 1948. Stingless bees (Meliponidae) on the Western hemisphere. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **90**: 546.
- SHIMRON, O.; HEFETZ, A. 1985. Mating behavior and sex attraction of *Eucera palestine* Friese (Hymenoptera: Anthophoridae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **58**: 526-531.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. 2002. Abelhas

- brasileiras: sistemática e identificação. 1ª edição. Belo Horizonte. Ministério do Meio Ambiente; Fundação Araucária. 253pp.
- SINGER, T. L. 1998. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *American zoologist* **38**: 394-405.
- SKANDALIS, D. A.; TATTERSALL, G. L.; PRAGER, S.; RICHARDS, M. H. 2009. Body size and shape of the large carpenter bee, *Xylocopa virginica* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **82**: 30-42.
- SMITH, B. H.; ROUBIK, D. W. 1983. Mandibular glands of stingless bees (Hymenoptera: Apidae): chemical analysis of their contents and biological function in two species of *melipona*. *Journal of Chemical Ecology* **9**: 1465-1472.
- SOMMEIJER, M. J.; BRUIJN, L. L. M. 1995. Drone congregations apart from the nest in *Melipona favosa*. *Insectes Sociaux* **42**: 123-127.
- SOMMEIJER, M. J., DE BRUIJN, L. L. M., MEEUWSEN, F. J. A. J. 2003. Behaviour of males, gynes and workers at drone congregation sites of the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae: Meliponini). *Entomologische Berichten* **64**: 10-15.
- SUGIURA, S. 2008. Male territorial behaviour of the endemic large carpenter bee, *Xylocopa* (*Koptortosoma*) *ogasawarensis* (Hymenoptera: Apidae), on the oceanic Ogasawara Islands. *European Journal of Entomology* **105**: 153-157.
- TERADA, Y. 1972. Enxameagem em *Frieseomelitta varia* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae). In: Homenagem à Warwick E. Kerr, Rio Claro/ São Paulo, 293-299.
- THOMAS, M. L. 2011. Detection of female mating status using chemical signals and cues. *Biological Reviews* **86**: 1-13.
- TÓTH, E.; STRASSMANN, J. E.; NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; QUELLER, D. C. 2002. Male production in stingless bees: variable outcomes of queen-worker conflict. *Molecular Ecology* **11**: 2661-2667.
- TRIVERS, R. L.; HARE, H. 1976. Haplodiploidy and the evolution of the social insects. *Science* **191**: 249-263.
- VAN NIEUWSTADT, M. G. L.; IRAHETA, C. E. R. 1996. Relation between size and foraging range in stingless bees (Apidae, Meliponinae). *Apidologie* **27**: 219-228.
- VAN VEEN, J. W., SOMMEIJER, M. J., MEEUWSEN, F. 1997. Behaviour of drones in *Melipona* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux* **44**: 435-447.
- VAN VEEN, J. W.; SOMMEIJER, M. J. 2000a. Observations on gynes and drones around nuptial flights in the stingless bees *Tetragonisca angustula* and *Melipona beecheii* (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* **31**: 47-54.
- VAN VEEN, J. W.; SOMMEIJER, M. J. 2000b. Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux* **47**: 70-75.
- VELTHUIS, H. H. W.; CAMARGO, J. M. F. 1975. Observations on male territories in a carpenter bee, *Xylocopa* (*Neoxylocopa*) *hirsutissima* Maidl (Hymenoptera, Anthophoridae). *Zeitschrift für Psychologie* **38**: 409-418.
- VELTHUIS, H. H. W.; GERLING, D. 1980. Observations on territoriality and mating behaviour of the carpenter bee *Xylocopa sulcatipes*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **28**: 82-91.
- 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* drone to their virgin Queen volatiles. *Apidologie* **42**: 543-550.
- VOLLET-NETO, A. 2011. Biologia térmica de *Scaptotrigona depilis* (Apidae,

- Meliponini): adaptações para lidar com altas temperaturas. Dissertação de Mestrado (Entomologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 97 pp.
- ZACEK, P.; KALINOVÁ, B.; SOBOTNIK, J.; HOVORKA, O.; PTACEK, V.; COPPÉE, A.; VERHEGGEN, F.; VALTEROVA, I. 2009. Comparison of age-dependent quantitative changes in the male labial gland secretion of *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum*. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 698-705.
- ZAYED, A.; Packer, L. 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10742-10746.
- ZAYED, A. 2009. Bee genetics and conservation. *Apidologie* **40**: 237-262.
- WANG, J. 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* **166**: 1963-1979.
- WEAVER, N.; WEAVER, E. C.; CLARKE, E. T. 1975. Reactions of five species of stingless bees to some volatile chemicals and to other species of bees. *Journal of Insect Physiology* **21**: 479-494.
- WENSELEERS, T.; ALVES, D. A.; FRANCOY, T. M.; BILLEN, J.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2011. Intraspecific Queen parasitism in a highly eusocial bee. *Biology Letters* doi: 10.1098/rsbl.2010.0819.
- WILLE, A.; OROZCO, E. 1975. Observations on the founding of a new colony by *Trigona cupira* (Hymenoptera: Apidae) in Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical* **22**: 253-287.
- WILSON, E. O. 1965. Chemical communication in the social insects. *Science* **149**: 1064-1071.
- WITTMANN, D. 1985. Aerial defense of the nest by workers of the stingless bee *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **16**: 111-114.
- WITTMANN, D.; SCHOLZ, E. 1989. Nectar dehydration by male carpenter bees as preparation for mating flights. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **25**: 387-391.

ANEXOS E APÊNDICES

Headspace Dinâmico

Uma cápsula de vidro (15cm de comprimento e 7cm de diâmetro interno) será especialmente construída para envolver os indivíduos, com entrada por um dos lados e uma saída pelo lado oposto, conectada a um “trap” adsorvente (tubo de vidro com 5,0 cm de comprimento e 0,50 cm de diâmetro interno) contendo Porapak Q 80-100 mesh (100-200 mg) e lã de vidro (previamente tratada com solvente e ativado a 150°C sobre vácuo) fechando as duas extremidades. Ar será passado sobre o sistema com adsorvente por meio de uma bomba operando com pilhas comuns (500 mL/min) durante um período de 3 horas (10:00 às 13:00). Os compostos voláteis serão extraídos com diclorometano e metanol. Após a evaporação, os mesmos serão analisados para detecção no CG/MS (Anexo III).

Enxameagens em ninhos-armadilha

Tabela 1. Agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini) em ninhos-armadilha (fundação de ninhos) e em colônias naturais ou racionais. Condição do ninho focal (em fundação, substituição de rainhas, fundado ou aborto da enxameagem).

Ninho-armadilha	Localidade	Datas	Operárias* e/ ou machos	Condição
NA #16	Ribeirão Preto	14.12.2010	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
		12.01.2011	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
		12.04.2011		abortou
		06.11.2011	Levado para USP.SP	fundado
NA #17	Ribeirão Preto	14.12.2010	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
		12.04.2011		abortou
NA #19	Ribeirão Preto	12.01.2011	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
		25.02.2011	muitas ♀♀ ; muitos ♂♂	em fundação
		12.04.2011		abortou
NA #23	Ribeirão Preto	14.12.2010	poucas ♀♀ inspecionando	
		17.01.2011	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
		25.02.2011	muitas ♀♀ ; muitos ♂♂	em fundação
		12.04.2011		abortou
NA #25	Ribeirão Preto	12.01.2011	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
		17.01.2011	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
		25.02.2011	muitas ♀♀ ; muitos ♂♂	em fundação

NA #26	Ribeirão Preto	12.04.2011		abortou
		12.01.2011	poucas ♀♀ inspecionando	em fundação
		12.04.2011	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	abortou
		05.05.2011	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
NA #27	Ribeirão Preto	31.05.2011	muitas ♀♀ ; muitos ♂♂	em fundação
		06.11.2011	levado para BeeLab USP	fundado
		31.05.2011	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
NA #48	Ribeirão Preto	27.12.2010	muitas ♀♀ ; nenhum ♂	roubada
NA #54 Sala Dani	Ribeirão Preto	12.01.2011	levado para BeeLab USP	em fundação
	Ribeirão Preto	17.02.2011	muitas ♀♀ ; poucos ♂	fundado
	Ribeirão Preto	17.02.2011	muitas ♀♀ ; muitos ♂♂	em fundação
NA #56	Ribeirão Preto	12.04.2011		em fundação
		02.05.2011	poucas ♀♀ inspecionando	fundado
		31.05.2011	muitas ♀♀ ; poucos ♂	em fundação
NA #51	Ribeirão Preto	06.11.2011		(<i>Scptotrigona</i>)
			poucas ♀♀ inspecionando	em fundação
NA #53	Ribeirão Preto	06.11.2011	levado para BeeLab USP	fundado
		08.02.2012		em fundação
NA #33	Ribeirão Preto	19.03.2012	levado para BeeLab USP	fundado
		06.11.2011	poucas ♀♀ inspecionando	escoteira
		08.02.2012	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
		19.03.2012	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	em fundação
NA #25	Ribeirão Preto	10.04.2012		abortou
		19.03.2012	muitas ♀♀ ; muitos ♂♂	em fundação
		10.04.2012		abortou
NA #38	Ribeirão Preto	10.04.2012		fundado
NA #89	Ribeirão Preto	28.12.2009	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	(<i>Scptotrigona</i>)
		07.01.2010		em fundação
NA #90	Ribeirão Preto	28.12.2009	poucas ♀♀ ; nenhum ♂	fundado
		21.01.2010		em fundação
NA #91	Ribeirão Preto	10.01.2010	poucas ♀♀ inspecionando	escoteira
Museu do Café**	Ribeirão Preto	13.03.2009	poucas ♀♀ ; poucos ♂	substituição
	Ribeirão Preto	22.03.2009	poucas ♀♀ ; poucos ♂	substituição
Parede almoxarifado	Ribeirão Preto	06.04.2009	poucas ♀♀ ; poucos ♂	fundação
	Ribeirão Preto	11.04.2009	poucas ♀♀ ; poucos ♂	fundação
Museu do Café***	Ribeirão Preto	17.03.2009	poucas ♀♀ ; poucos ♂	substituição
	Ribeirão Preto	28.03.2009	poucas ♀♀ ; poucos ♂	substituição

* fundadoras

** toco de árvore

*** registro de água

Quantidade de ninhos naturais e colmeias que tiveram operárias genotipadas e identificação de suas colônias

Tabela 2. Quantidade de operárias guardadas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini) capturas na entrada de 75 ninhos naturais e racionais dentro do *campus* da FFCLR-USP e suas respectivas identificações nas placas para para genotipagem com marcadores moleculares (microsatélites) e códigos de georreferenciamento (GPS) de suas colônias. Ribeirão Preto/ SP, Fevereiro de 2011.

Ninhos	Tipo	Quantidade	Identificação do ninho	Código Placa PCR	código GPS
1	Racional	5	Mauro trilha (mtrilha)	276 à 280	cha1
2	Racional	5	Cônsul (cônsul)	6 à 10	cha2
3	Racional	5	Fundação armad. 25 (NA25)	99 à 103	cha3
4	Racional	5	23 (23)	119 à 123	cha4
5	Racional	5	Fundação armad. NA27	184 à 188	cha5
6	Racional	5	93 mauro (mauro)	159 à 163	cha6
7	Racional	5	Yara ("sura") (yara)	231 à 235	cha7
8	Racional	5	Fundação DANI (DANI)	94 à 98	cha8
9	Racional	5	mesa melipon. (mesamelip)	221 à 225	cha9
10	Racional	5	fundação almox. (almox)	1 à 5	cha10
11	Racional	5	frente 93 mauro (fMar)	336 à 340	cha11
12	Racional	5	157 (157)	281 à 285	cha12
13	Racional	5	Melipon. Túlio (mTul)	291 à 295	cha13
14	Racional	5	lado tronquinho (lTron)	366 à 370	cha14
15	Racional	5	Tronquinho (tronq.)	346 à 350	cha15
16	Racional	5	5 (5)	376 à 380	cha16
17	Racional	5	1 (1)	179 à 183	cha17
18	Racional	5	153 (153)	256 à 260	cha18
19	Racional	5	93 (93)	11 à 15	cha19
20	Racional	5	23 (23)	371 à 375	cha20
21	Racional	5	710 (710)	341 à 345	cha21
22	Racional	5	2 azul (azul)	109 à 113	cha22
23	Racional	5	42 (42)	129 à 133	cha23
24	Racional	5	49 (49)	37 à 41	cha24
25	Racional	5	Fundação armad. 23 (NA23)	212 à 216	cha25
26	Racional	5	Fundação armad. 56 (NA56)	164 à 168	cha26
27	Racional	5	Fundação armad. 27 (rNA27)	144 à 148	cha27
28	Racional	7	Fundação armad. 26 (NA26)	316 à 320	cha28
29	Racional	7	Fundação armad. 89 (NA89)	68 à 72	cha29
30	Racional	7	Fundação armad. 90 (NA90)	84 à 88	cha30
31	Natural	5	CHNR 00	226 à 230	CHNR00
32	Natural	5	CHNR 01	351 à 355	CHNR01
33	Natural	5	CHNR 02	286 à 290	CHNR02
34	Natural	5	CHNR 03	104 à 108	CHNR03
35	Natural	5	CHNR 04	296 à 300	CHNR04
36	Natural	5	CHNR 05	134 à 138	CHNR05
37	Natural	5	CHNR 06	73 à 78	CHNR06
38	Natural	5	CHNR 07	16 à 20	CHNR07
39	Natural	5	CHNR 08	57 à 62	CHNR08
40	Natural	5	CHNR 09	261 à 265	CHNR09
41	Natural	5	CHNR 10	124 à 128	CHNR10
42	Natural	5	CHNR 11	26 à 31	CHNR11
43	Natural	5	CHNR 12	236 à 240	CHNR12
44	Natural	5	CHNR 13	326 à 330	CHNR13
45	Natural	5	CHNR 14	149 à 153	CHNR14
46	Natural	5	CHNR 15	21 à 25	CHNR15
47	Natural	5	CHNR 16	203 à 206	CHNR16
48	Natural	5	CHNR 17	194 à 197	CHNR17
49	Natural	5	CHNR 18	47 à 51	CHNR18

50	Natural	5	CHNR 19	189 à 193	CHNR19
51	Natural	5	CHNR 20	169 à 173	CHNR20
52	Natural	5	CHNR 21	207 à 211	CHNR21
53	Natural	5	CHNR 22	52 à 56	CHNR22
54	Natural	5	CHNR 23	241 à 245	CHNR23
55	Natural	5	CHNR 24	271 à 275	CHNR24
56	Natural	5	CHNR 25	251 à 255	CHNR25
57	Natural	5	CHNR 26	246 à 250	CHNR26
58	Natural	5	CHNR 27	301 à 305	CHNR27
59	Natural	5	CHNR 28	331 à 335	CHNR28
60	Natural	5	CHNR 29	198 à 202	CHNR29
61	Natural	5	CHNR 30	306 à 310	CHNR30
62	Natural	5	CHNR 31	361 à 365	CHNR31
63	Natural	5	CHNR 32	217 à 220	CHNR32
64	Natural	5	CHNR 33	89 à 93	CHNR33
65	Natural	5	CHNR 34	79 à 83	CHNR34
66	Natural	5	CHNR 35	32 à 36	CHNR35
67	Natural	5	CHNR 36	114 à 118	CHNR36
68	Natural	5	CHNR 37	139 à 143	CHNR37
69	Natural	5	CHNR 38	174 à 178	CHNR38
70	Natural	5	CHNR 39	42 à 46	CHNR39
71	Natural	5	CHNR 40	266 à 270	CHNR40
72	Natural	5	CHNR 41	356 à 360	CHNR41
73	Natural	5	Galinheiro Natural (GalNat)	154 à 158	CHNR42
74	Natural	5	Árvore Natural (ArNat)	311 à 315	CHNR43
75	Natural	5	Ninho Natural (CHNR 44)	63 à 67	CHNR44

Genótipo dos machos

Tabela 4. Genótipos dos machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini), identificados como CHAMA, no *campus* da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto. Os indivíduos pertencem a cinco agregações que ocorrem na frente de ninhos-armadilha em processo de fundação pelas operárias.

Indivíduos	tang57	tang03	Tang12	tang11	tang65	tang60
CHAMA1	156	219	217	184	190	139
CHAMA2	156	217	223	184	190	139
CHAMA3	156	219	215	186	204	151
CHAMA4	198	219	217	186	200	139
CHAMA5	198	225	199	184	188	151
CHAMA6	156	225	223	184	194	141
CHAMA7	156	227	219	182	202	139
CHAMA8	156	217	207	184	220	157
CHAMA9	156	219	223	190	210	149
CHAMA10	178	221	221	182	214	143
CHAMA11	156	217	219	186	200	149
CHAMA12	156	219	219	186	200	149
CHAMA13	156	221	217	182	194	147
CHAMA14	156	221	219	182	194	139
CHAMA15	194	221	215	184	192	141
CHAMA16	156	219	199	186	224	147
CHAMA17	156	219	221	184	188	143
CHAMA18	156	227	219	184	194	147
CHAMA19	156	219	219	202	224	151
CHAMA20	156	217	217	186	222	147
CHAMA21	156	219	217	184	206	149
CHAMA22	156	223	199	184	200	147
CHAMA23	156	217	207	190	200	149
CHAMA24	158	219	207	190	200	149
CHAMA25	196	219	205	208	192	149

CHAMA26	156	225	217	186	190	147
CHAMA27	156	217	227	202	190	149
CHAMA28	156	219	217	206	192	155
CHAMA29	156	217	217	182	210	147
CHAMA30	156	219	207	184	212	147
CHAMA31	156	225	219	182	210	139
CHAMA32	156	219	199	186	204	153
CHAMA33	156	221	223	184	218	147
CHAMA34	156	223	207	190	192	147
CHAMA35	156	217	221	184	204	141
CHAMA36	156	225	221	184	204	141
CHAMA37	156	225	221	182	196	149
CHAMA38	156	219	207	184	188	147
CHAMA39	156	225	219	184	192	147
CHAMA40	156	217	207	182	236	147
CHAMA41	156	219	217	184	192	139
CHAMA42	196	219	221	184	188	143
CHAMA43	200	219	207	182	188	149
CHAMA44	156	219	207	182	208	147
CHAMA45	156	217	199	184	192	147
CHAMA46	156	219	227	182	192	145
CHAMA47	156	219	227	184	202	147
CHAMA48	156	219	215	184	202	147
CHAMA49	156	219	221	184	218	147
CHAMA50	156	219	215	186	216	0
CHAMA51	156	219	0	184	149	
CHAMA52	180	217	219	184	218	143
CHAMA53	198	219	199	208	190	147
CHAMA54	156	219	217	186	192	149
CHAMA55	156	219	229	198	202	147
CHAMA56	156	219	221	186	190	149
CHAMA57	178	217	217	182	196	149
CHAMA58	156	219	207	186	190	147
CHAMA59	156	217	227	184	194	149
CHAMA60	156	0	219	184	194	147
CHAMA61	180	219	217	184	190	147
CHAMA62	156	219	225	188	190	147
CHAMA63	194	219	225	208	188	153
CHAMA64	156	219	227	184	192	141
CHAMA65	156	221	207	198	192	149
CHAMA66	156	219	199	184	204	153
CHAMA67	156	219	221	194	190	147
CHAMA68	156	225	215	186	190	149
CHAMA69	156	225	207	184	190	147
CHAMA70	156	219	217	186	210	149
CHAMA71	156	219	215	196	188	147
CHAMA72	156	219	199	196	188	147
CHAMA73	156	201	211	186	192	153
CHAMA74	156	0	223	186	222	147
CHAMA75	156	219	207	184	192	151
CHAMA76	194	221	205	188	196	147
CHAMA77	194	217	207	186	206	141
CHAMA78	156	217	221	184	200	151
CHAMA79	156	0	225	210	228	149
CHAMA80	156	219	221	206	190	149
CHAMA81	194	219	217	194	222	139
CHAMA82	156	219	221	184	206	145
CHAMA83	156	225	219	184	190	141
CHAMA84	156	217	217	184	190	141
CHAMA85	156	0	217	182	204	151
CHAMA86	196	217	205	184	224	137
CHAMA87	180	217	223	182	192	139
CHAMA88	156	219	217	186	190	141
CHAMA89	156	217	199	186	224	153
CHAMA90	194	221	217	182	192	141
CHAMA91	156	0	223	190	202	141
CHAMA92	156	219	219	184	190	147

CHAMA93	156	219	205	184	192	141
CHAMA94	194	225	217	198	222	145
CHAMA95	0	217	227	184	188	143
CHAMA96	156	221	205	184	188	143
CHAMA97	156	225	217	184	212	147
CHAMA98	202	221	205	184	220	147
CHAMA99	194	219	221	206	208	145
CHAMA100	156	221	219	184	192	147
CHAMA101	156	219	217	184	196	153
CHAMA102	198	219	207	184	192	153
CHAMA103	156	217	205	184	192	153
CHAMA104	156	225	227	184	190	149
CHAMA105	156	219	215	186	208	149
CHAMA106	156	219	217	184	224	153
CHAMA107	156	221	225	196	192	139
CHAMA108	156	219	223	184	0	147
CHAMA109	156	225	215	206	224	147
CHAMA110	156	219	219	184	196	149
CHAMA111	156	219	215	186	216	141
CHAMA112	156	221	221	212	202	147
CHAMA113	156	217	207	182	208	149
CHAMA114	156	221	217	186	238	141
CHAMA115	156	225	221	184	212	147
CHAMA116	156	219	223	184	218	147
CHAMA117	156	221	217	184	218	147
CHAMA118	156	217	199	184	194	141
CHAMA119	156	219	207	184	192	149
CHAMA120	0	0	0	0	0	0
CHAMA121	194	217	207	186	198	149
CHAMA122	156	219	225	184	194	149
CHAMA123	156	219	217	186	192	139
CHAMA124	178	219	225	186	212	147
CHAMA125	156	221	207	194	222	147
CHAMA126	156	217	207	186	194	147
CHAMA127	194	217	207	210	214	153
CHAMA128	156	225	221	188	196	141
CHAMA129	156	219	221	184	194	149
CHAMA130	156	225	227	182	212	147
CHAMA131	156	221	217	184	214	149
CHAMA132	156	217	217	184	224	141
CHAMA133	156	225	215	182	214	147
CHAMA134	156	219	217	184	224	139
CHAMA135	194	219	223	184	210	155
CHAMA136	194	225	227	194	228	147
CHAMA137	156	219	223	186	212	149
CHAMA138	156	225	199	184	192	141
CHAMA139	156	217	207	186	192	149
CHAMA140	156	217	207	184	192	139
CHAMA141	156	219	207	184	198	147
CHAMA142	156	219	199	188	196	147
CHAMA143	156	219	229	212	194	147
CHAMA144	156	0	217	194	216	153
CHAMA145	156	219	227	184	204	147
CHAMA146	156	219	215	182	214	151
CHAMA147	156	217	207	194	220	147
CHAMA148	156	217	227	182	190	153
CHAMA149	156	217	217	190	194	149
CHAMA150	156	221	217	184	234	141
CHAMA151	194	219	211	184	192	153
CHAMA152	202	219	215	182	204	147
CHAMA153	156	219	199	184	196	141
CHAMA154	156	221	207	186	222	149
CHAMA155	156	0	207	182	192	147
CHAMA156	156	0	227	184	212	151
CHAMA157	156	219	215	184	192	149
CHAMA158	156	221	215	184	204	147
CHAMA159	156	219	219	180	206	141

CHAMA160	156	219	207	184	194	141
CHAMA161	178	219	215	184	216	143
CHAMA162	156	219	217	184	190	149
CHAMA163	156	219	217	184	204	147
CHAMA164	156	225	223	182	196	147
CHAMA165	156	225	215	184	204	139
CHAMA166	156	219	207	182	202	139
CHAMA167	156	225	219	182	202	147
CHAMA168	156	219	207	190	190	147
CHAMA169	156	217	219	182	190	149
CHAMA170	156	219	211	184	192	149
CHAMA171	0	0	219	0	0	0
CHAMA172	156	219	215	184	214	141
CHAMA173	156	221	217	182	194	149
CHAMA174	156	219	215	182	198	145
CHAMA175	0	219	0	184	204	151
CHAMA176	156	219	223	184	192	149
CHAMA177	156	219	215	186	192	139
CHAMA178	156	225	199	182	218	145
CHAMA179	156	217	199	182	224	145
CHAMA180	156	219	207	184	194	147
CHAMA181	198	219	225	184	194	149
CHAMA182	156	219	205	186	190	137
CHAMA183	156	227	219	194	192	147
CHAMA184	198	219	205	184	192	149
CHAMA185	156	219	199	184	192	149
CHAMA186	156	219	227	210	196	141
CHAMA187	156	219	207	184	202	143
CHAMA188	204	219	215	180	214	139
CHAMA189	156	219	215	190	202	149
CHAMA190	156	219	225	184	194	147
CHAMA191	206	217	205	184	202	149
CHAMA192	156	219	223	184	220	141
CHAMA193	194	225	205	0	224	149
CHAMA194	156	219	199	186	212	147
CHAMA195	156	221	207	184	204	153
CHAMA196	194	217	227	184	188	147
CHAMA197	194	219	207	184	224	141
CHAMA198	156	219	221	184	214	141
CHAMA199	156	219	217	184	202	149
CHAMA200	156	219	219	184	190	149
CHAMA201	156	225	207	184	212	141
CHAMA202	156	219	217	186	224	149
CHAMA203	156	219	205	184	194	143
CHAMA204	156	219	217	204	208	151
CHAMA205	156	219	215	0	192	149
CHAMA206	204	219	223	184	190	149
CHAMA207	178	219	219	182	190	149
CHAMA208	156	221	217	188	218	147
CHAMA209	156	217	207	184	202	151
CHAMA210	198	219	217	182	224	149
CHAMA211	156	225	217	184	190	147
CHAMA212	156	217	227	208	192	149
CHAMA213	202	219	217	194	200	147
CHAMA214	192	219	221	210	204	149
CHAMA215	156	217	221	186	188	147
CHAMA216	156	219	207	182	194	147
CHAMA217	180	217	219	184	192	143
CHAMA218	156	217	227	0	194	147
CHAMA219	156	219	215	188	214	149
CHAMA220	156	219	217	186	194	141
CHAMA221	156	217	227	182	192	149
CHAMA222	156	225	207	190	206	149
CHAMA223	156	217	207	188	210	149
CHAMA224	194	225	218	188	204	147
CHAMA225	202	219	219	184	190	149
CHAMA226	192	219	207	182	214	147

CHAMA227	156	219	207	182	214	145
CHAMA228	194	219	217	182	208	143
CHAMA229	156	217	217	184	218	147
CHAMA230	156	219	223	186	190	139
CHAMA231	156	219	217	184	192	149
CHAMA232	156	219	225	200	210	147
CHAMA233	156	219	217	186	212	149
CHAMA234	194	219	225	186	190	145
CHAMA235	156	217	221	184	204	139
CHAMA236	156	219	217	182	212	151
CHAMA237	156	221	217	182	200	149
CHAMA238	156	219	219	182	200	147
CHAMA239	156	217	217	182	216	143
CHAMA240	192	221	217	184	208	151
CHAMA241	178	219	199	190	202	151
CHAMA242	156	221	207	182	226	147
CHAMA243	156	217	199	0	212	143
CHAMA244	156	219	215	184	192	149
CHAMA245	156	219	217	180	214	147
CHAMA246	156	225	219	208	222	149
CHAMA247	156	217	215	184	192	139
CHAMA248	156	221	217	182	224	147
CHAMA249	156	219	207	184	192	149
CHAMA250	194	219	219	186	190	147
CHAMA251	156	221	207	208	192	147
CHAMA252	178	219	199	184	192	153
CHAMA253	156	219	229	184	220	149
CHAMA254	156	219	199	184	190	155
CHAMA255	156	219	223	184	192	147
CHAMA256	178	217	217	184	206	147
CHAMA257	178	219	207	188	204	149
CHAMA258	156	219	221	184	190	149
CHAMA259	156	219	219	182	194	147
CHAMA260	156	219	207	184	212	145
CHAMA261	156	219	207	184	190	149
CHAMA262	156	225	207	188	216	153
CHAMA263	156	217	217	0	224	151
CHAMA264	156	219	217	182	204	147
CHAMA265	156	221	221	188	216	145
CHAMA266	156	217	217	184	190	149
CHAMA267	156	219	207	186	190	147
CHAMA268	156	221	199	184	218	147
CHAMA269	156	221	207	184	188	149
CHAMA270	156	219	207	182	222	143
CHAMA271	156	225	217	184	190	147
CHAMA272	156	219	217	182	188	147
CHAMA273	156	219	217	184	192	147
CHAMA274	156	217	217	184	212	147
CHAMA275	156	219	221	0	222	151
CHAMA276	156	219	205	182	196	147
CHAMA277	196	219	217	0	214	147
CHAMA278	156	221	217	184	192	141
CHAMA279	194	221	217	204	202	141
CHAMA280	198	219	219	190	190	145
CHAMA281	200	219	221	0	220	143
CHAMA282	156	219	221	186	190	147
CHAMA283	156	225	217	184	202	151
CHAMA284	156	217	207	184	190	147
CHAMA285	156	225	199	186	206	147
CHAMA286	156	221	223	186	220	153
CHAMA287	156	225	217	0	190	147
CHAMA288	156	217	221	0	200	141
CHAMA289	156	219	219	190	194	153
CHAMA290	156	219	223	182	240	141
CHAMA291	156	219	215	186	194	149
CHAMA292	156	225	219	184	194	147
CHAMA293	156	219	225	184	204	153

CHAMA294	156	221	215	184	204	141
CHAMA295	202	219	217	184	194	151
CHAMA296	156	219	221	184	218	139
CHAMA297	194	219	219	186	190	149
CHAMA298	156	219	217	182	196	149
CHAMA299	156	217	215	186	222	149
CHAMA300	156	217	217	184	190	147
CHAMA301	156	219	217	184	210	139
CHAMA302	156	219	215	184	230	143
CHAMA303	178	219	227	184	194	149
CHAMA304	156	225	223	204	194	139
CHAMA305	156	219	219	190	194	141
CHAMA306	156	219	221	184	202	145
CHAMA307	156	219	207	184	192	147
CHAMA308	156	219	207	182	210	141
CHAMA309	156	219	207	184	192	151
CHAMA310	156	219	225	184	194	149
CHAMA311	196	219	217	186	230	149
CHAMA312	156	217	207	184	202	155
CHAMA313	196	217	227	184	194	147
CHAMA314	196	217	227	180	206	139
CHAMA315	178	221	217	180	216	139
CHAMA316	194	221	223	200	194	147
CHAMA317	156	221	219	182	194	139
CHAMA318	156	221	217	196	194	147
CHAMA319	156	225	219	182	226	139
CHAMA320	156	219	199	196	210	155
CHAMA321	156	217	207	182	216	147
CHAMA322	156	219	207	206	196	147
CHAMA323	192	217	217	184	212	149
CHAMA324	156	225	207	184	194	147
CHAMA325	156	217	219	184	202	155
CHAMA326	202	221	221	202	202	153
CHAMA327	184	219	217	182	192	155
CHAMA328	194	219	225	184	200	143
CHAMA329	202	217	199	186	210	149
CHAMA330	156	221	215	186	224	139
CHAMA331	156	217	207	186	190	149
CHAMA332	156	221	207	186	202	149
CHAMA333	156	217	219	182	222	147
CHAMA334	198	219	219	180	202	155
CHAMA335	156	219	215	182	232	147
CHAMA336	156	217	227	186	210	141
CHAMA337	156	219	211	186	212	151
CHAMA338	180	219	217	184	220	147
CHAMA339	202	219	219	184	192	149
CHAMA340	156	223	221	190	204	155
CHAMA341	156	219	221	184	224	141
CHAMA342	156	219	223	184	202	149
CHAMA343	156	219	219	208	196	149
CHAMA344	156	219	217	182	210	149
CHAMA345	156	225	219	184	216	151
CHAMA346	156	0	219	184	210	151
CHAMA347	156	217	217	202	194	147
CHAMA348	156	217	223	184	190	149
CHAMA349	156	225	217	186	196	155
CHAMA350	156	217	207	186	192	0
CHAMA351	156	219	219	212	204	141
CHAMA352	194	217	207	184	194	147
CHAMA353	156	219	221	196	226	149
CHAMA354	156	225	215	184	194	147
CHAMA355	156	217	207	184	190	147
CHAMA356	196	219	207	186	188	137
CHAMA357	156	225	223	184	194	149
CHAMA358	156	217	217	202	218	155
CHAMA359	0	0	217	180	206	149
CHAMA360	156	219	217	186	202	147

CHAMA361	194	217	219	184	224	149
CHAMA362	198	219	221	184	194	149
CHAMA363	156	217	215	184	192	147
CHAMA364	156	219	219	180	190	139
CHAMA365	194	217	199	184	204	147
CHAMA366	156	221	207	184	218	155
CHAMA367	156	217	217	186	224	141
CHAMA368	192	217	207	182	194	149
CHAMA369	156	217	207	182	202	147
CHAMA370	156	219	207	182	194	141
CHAMA371	194	219	207	200	212	141
CHAMA372	156	219	217	182	192	149
CHAMA373	156	225	207	184	204	149
CHAMA374	156	219	199	184	192	147
CHAMA375	178	225	207	182	206	149
CHAMA376	156	219	207	180	190	149

Genótipos das operárias

Tabela 6. Genótipos das operárias guardas de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apoidea: Meliponini), identificadas como CHAOP. As operárias foram coletadas em frente de ninhos-armadilha em processo de fundação, ninhos naturais e ninhos racionais. *Campus* da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto.

Indivíduo	Tang57		Tang03		Tang12		Tang11		Tang65		Tang60		Colônias
CHAOP1	156	156	0	0	205	205	196	196	220	226	145	149	Almox
CHAOP2	156	156	219	219	207	217	196	196	220	224	139	145 ¹⁷⁴	Almox
CHAOP3	156	156	219	219	207	207	196	196	220	220	139	145	Almox
CHAOP4	156	156	219	219	207	217	196	196	220	220	145	149	Almox
CHAOP5	156	156	219	219	207	217	182	186	212	220	139	145	Almox
CHAOP6	156	156	0	0	207	227	182	186	220	220	139	147	Consul
CHAOP7	156	156	217	217	207	227	182	186	220	222	139	147	Consul
CHAOP8	156	156	217	217	207	227	182	186	220	222	139	147	Consul
CHAOP9	156	156	217	217	207	227	182	186	220	220	139	147	Consul
CHAOP10	156	156	217	217	207	227	182	186	220	222	139	147	Consul
CHAOP11	156	156	0	0	207	219	180	180	220	226	137	147	93
CHAOP12	156	196	219	219	207	217	0	0	220	226	0	0	93
CHAOP13	156	196	219	219	207	219	0	0	220	226	141	147	93
CHAOP14	156	196	219	221	207	219	180	180	220	222	137	147	93
CHAOP15	156	196	0	0	207	219	194	198	218	220	137	147	93
CHAOP16	156	186	219	219	219	227	198	198	218	220	139	147	CHNR7
CHAOP17	156	186	217	217	215	219	192	198	218	224	147	149	CHNR7
CHAOP18	156	156	217	217	219	227	198	198	218	224	139	147	CHNR7
CHAOP19	156	156	217	217	215	219	198	198	218	220	147	147	CHNR7
CHAOP20	156	156	219	219	215	219	182	182	218	226	139	147	CHNR7
CHAOP21	156	156	225	225	199	221	184	184	220	226	141	155	CHNR15
CHAOP22	156	156	0	0	199	221	0	0	220	226	141	147	CHNR15
CHAOP23	156	196	0	0	199	207	0	0	218	220	141	159	CHNR15
CHAOP24	156	156	225	225	199	207	184	184	218	220	141	147	CHNR15
CHAOP25	156	196	225	225	199	207	0	0	220	220	141	147	CHNR15
CHAOP26	194	194	217	219	207	217	184	184	200	200	147	149	CHNR11
CHAOP27	192	194	219	219	207	217	180	188	218	220	147	149	CHNR11
CHAOP28	192	194	219	219	207	217	180	188	220	220	147	149	CHNR11
CHAOP29	192	194	219	219	207	217	196	196	218	220	147	149	CHNR11
CHAOP30	192	194	217	219	207	217	200	200	218	220	147	149	CHNR11
CHAOP31	194	196	219	219	207	217	200	200	218	220	147	149	CHNR11
CHAOP32	194	196	219	219	207	217	200	200	218	220	147	149	CHNR53
CHAOP33	156	156	219	221	207	225	200	200	218	220	139	147	CHNR53
CHAOP34	156	200	219	221	207	225	204	204	220	220	139	147	CHNR53
CHAOP35	156	200	219	221	207	225	198	198	220	220	139	147	CHNR53
CHAOP36	156	156	219	219	207	225	204	204	196	196	147	147	CHNR53
CHAOP37	156	156	219	219	219	221	0	0	220	220	147	147	49
CHAOP38	156	156	219	219	219	221	204	204	220	220	147	149	49
CHAOP39	156	156	217	219	219	221	200	200	218	220	147	149	49
CHAOP40	156	156	217	219	221	221	200	200	218	222	147	149	49

Genótipo das rainhas

Tabela 7. Resultados parciais da saída do *Colony 1.2* mostrando a reconstrução das famílias (colônias) e os genótipos parentais. Aqui estão representados somente os genótipos parentais que foram utilizados para estimar o parentesco dos machos relacionados a cada agregação específica às rainhas aparentadas às operárias das respectivas fundações.

FamilyID= 76: Pure fullSib family (-1 indicating genotype unknown)
Family LogLikelihood= -6.32797412E+01

Female parent ID=RAINHA NA26						
Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2	
1	-1 -1	184/186	0.8475	184 184	0.1148	
2	-1 -1	189/211	0.7661	201 211	0.2294	
3	-1 -1	215/223	0.9986			
4	-1 -1	184/188	0.9948	184 184	0.0022	
5	-1 -1	192/226	0.8610	192 192	0.0331	
6	-1 -1	147/147	0.5902	141 141	0.2641	

Male parent ID=Unknown, its genotypes at each locus						
Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2	
1	-1	184	0.9999			
2	-1	201	0.5005	189	0.4995	
3	-1	227	0.9995			
4	-1	186	0.9987	184	0.0013	
5	-1	192	0.9486	226	0.0514	
6	-1	141	0.6523	147	0.3477	

Fullsib family size= 5, members:
815 816 817 818 819

FamilyID= 42: Pure fullSib family (-1 indicating genotype unknown)
Family LogLikelihood= -4.33590715E+01

Female parent ID=RAINHA NA25						
Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2	
1	-1 -1	156/186	0.3216	186 186	0.2217	
2	-1 -1	219/219	0.2365	211 219	0.1366	
3	-1 -1	217/227	0.0939	215 217	0.0939	
4	-1 -1	180/184	0.4838	180 186	0.4480	
5	-1 -1	210/224	0.3330	210 220	0.0921	
6	-1 -1	141/147	0.7908	147 147	0.0555	

Male parent ID=Unknown, its genotypes at each locus						
Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2	
1	-1	186	0.9849	156	0.0064	
2	-1	211	0.5499	219	0.4500	
3	-1	215	0.5070	227	0.4929	
4	-1	184	0.4682	186	0.4438	
5	-1	210	0.4404	224	0.3960	
6	-1	147	0.6149	141	0.3530	

Fullsib family size= 14, members:
 64 70 106 131 133 144
 153 186 252 598 599 600
 601 602

FamilyID= 35: Pure fullSib family (-1 indicating genotype unknown)
 Family LogLikelihood= -7.08342909E+01

Female parent ID=RAINHA NA23

Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2
1	-1 -1	156/194	0.9514	156 156	0.0247
2	-1 -1	217/219	0.8094	219 225	0.1400
3	-1 -1	207/217	0.4866	217 225	0.4865
4	-1 -1	196/200	0.9832	196 196	0.0026
5	-1 -1	192/226	0.9926	192 218	0.0054
6	-1 -1	141/149	0.8623	149 149	0.0774

Male parent ID=Unknown, its genotypes at each locus

Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2
1	-1	156	0.9772	194	0.0228
2	-1	219	0.8382	217	0.1609
3	-1	225	0.4992	207	0.4968
4	-1	196	0.9945	200	0.0045
5	-1	218	0.9938	226	0.0057
6	-1	149	0.9985	141	0.0014

Fullsib family size= 5, members:
 195 711 712 714 715

FamilyID= 27: Pure fullSib family (-1 indicating genotype unknown)
 Family LogLikelihood= -7.84430633E+01

Female parent ID=RAINHA NA56

Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2
1	-1 -1	184/184	0.6540	156 184	0.1634
2	-1 -1	209/219	0.7269	209 209	0.2989
3	-1 -1	217/227	0.8703	217 223	0.0344
4	-1 -1	180/184	0.9931	180 182	0.0066
5	-1 -1	190/192	0.8885	192 214	0.1064
6	-1 -1	147/147	0.9933	139 139	0.0065

Male parent ID=Unknown, its genotypes at each locus

Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2
1	-1	184	1.0000		
2	-1	209	0.9998		
3	-1	227	0.4911	223	0.4910
4	-1	182	0.9127	184	0.0216
5	-1	192	0.3356	190	0.3320
6	-1	139	0.6900	147	0.3100

Fullsib family size= 4, members:

663 664 665 666

FamilyID= 28: Pure fullSib family (-1 indicating genotype unknown)
 Family LogLikelihood= -4.87876730E+01

Female parent ID=RAINHA DANI

Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2
1	-1 -1	156/200	0.8774	156 156	0.0435
2	-1 -1	219/219	0.6073	219 221	0.1604
3	-1 -1	199/217	0.6920	207 223	0.1200
4	-1 -1	186/194	0.9514	184 194	0.0109
5	-1 -1	220/220	0.4613	194 220	0.2890
6	-1 -1	145/147	0.5005	145 145	0.4991

Male parent ID=Unknown, its genotypes at each locus

Locus	Obs.Genotype	Est.Genotype1	PstProb1	Est.Genotype2	PstProb2
1	-1	156	1.0000		
2	-1	221	0.7091	219	0.2909
3	-1	223	0.8833	217	0.1167
4	-1	180	0.9591	194	0.0355
5	-1	220	0.5311	226	0.4689
6	-1	145	0.4991	143	0.4989

Fullsib family size= 10, members:

150 204 240 279 284
 358 593 594 595 733

Significância de parentesco entre machos e rainhas

Tabela 8. Significâncias de parentesco atribuída aos pares machos-rainhas estimada pelo programa *Kingroup 2* considerando um relacionamento genético de 0.5.

Coordenadas geográficas das colônias naturais, colmeias e ninhos-armadilha	razão de probabilidade		
	Valor de <i>p</i>	razão	tipo II
	* 5%	3.14	59%
	** 1%	9.29	80%
	*** 0.1%	33.46	93%

Tabela 8. Ninhos-armadilha (NA), colônias naturais (Chnr) e colônias racionais (Geneti e melrp) de *Tetragonisca angustula*. USP Ribeirão Preto. datum WGS84 (UTM).

ID	Latitude	Longitude
NA00,-21.1632615420968,-47.8611525055021		
NA01,-21.1629064846784,-47.8617129195482		
NA02,-21.1628490686417,-47.8619578387589		
NA03,-21.1629203986377,-47.8622209466994		
NA04,-21.1631080694497,-47.8622046858073		
NA05,-21.1633867677301,-47.8627760801465		

NA06,-21.1634601093829,-47.8623004909605
NA07,-21.1635848321021,-47.862573992461
NA08,-21.1641496885568,-47.8628942649812
NA09,-21.1641524545849,-47.8631513379515
NA10,-21.1635015159846,-47.8617358021439
NA11,-21.1641331762076,-47.8618726786226
NA12,-21.1646949313581,-47.8608896490187
NA13,-21.1648335680366,-47.860776912421
NA14,-21.1646386049688,-47.8606907464564
NA15,-21.1670791637153,-47.8640772029758
NA16,-21.1674451176077,-47.8644038457424
NA17,-21.167609654367,-47.8642300050706
NA18,-21.1671882122755,-47.8634177148343
NA19,-21.1677934695035,-47.8616118337959
NA20,-21.1678301822394,-47.8614872787148
NA21,-21.168529484421,-47.8603667020798
NA22,-21.1686761677265,-47.8601493593306
NA23,-21.1692178901285,-47.8588378429413
NA24,-21.168875573203,-47.8587249387056
NA25,-21.1655995901674,-47.8617431782186
NA26,-21.1655916273594,-47.8616433497519
NA27,-21.1656304355711,-47.8615040425212
NA28,-21.1660782806575,-47.8596462775022
NA29,-21.1661710683257,-47.8597832378
NA30,-21.166002843529,-47.8597428370268
NA31,-21.1658374685794,-47.8584999684245
NA32,-21.1657667253167,-47.8584530297667
NA33,-21.1657983250916,-47.8582242038101
NA34,-21.1659771110863,-47.8579926118255
NA35,-21.1667281296104,-47.8570350632072
NA36,-21.166724357754,-47.8570516593755
NA37,-21.1676602810621,-47.855567643419
NA38,-21.1677145957947,-47.8554495424033
NA39,-21.1673516593874,-47.8552393242717
NA40,-21.167133981362,-47.8555920347572
NA41,-21.1670353263617,-47.8557106386871
NA42,-21.1670351587236,-47.855892861262
NA43,-21.1665112897754,-47.8564428817481
NA44,-21.1663884948939,-47.8564526885748
NA45,-21.1662688851357,-47.8564670216293
NA46,-21.1635280027986,-47.8605465777219
NA47,-21.1634758673608,-47.8606426343322
NA48,-21.1633689142764,-47.8607786726207
NA49,-21.1633539944887,-47.8608589712531
NA50,-21.1633066367358,-47.8606362640858
NA51,-21.1685970425606,-47.8592796530575
NA52,-21.1684055160731,-47.8596057090909

NA53,-21.1680866684765,-47.8601781092585
NA54,-21.1677210498601,-47.8612178843469
NA55,-21.1661839764565,-47.8614187985659
NA56,-21.1661014147103,-47.8610968496651
NA57,-21.1662568151951,-47.8609016351402
NA58,-21.1663869861514,-47.8604344278574
NA59,-21.1664053425193,-47.8602688852698
NA60,-21.1663187574595,-47.860005190596
NA61,-21.1662001535297,-47.8599611017853
NA62,-21.166914626956,-47.8577818907798
NA63,-21.1673482228071,-47.8571426868439
NA64,-21.1628501582891,-47.8595502208919
NA65,-21.1629891302437,-47.8591166250408
NA66,-21.163161881268,-47.8587461449206
NA67,-21.1607154551894,-47.860975060612
NA68,-21.1610735300929,-47.8602625150234
NA69,-21.1632560938597,-47.8557134885341
NA70,-21.1649805027992,-47.8555762767792
NA71,-21.1654667370022,-47.8551148530096
NA72,-21.1665532831103,-47.8546853642911
NA73,-21.1671476438642,-47.8542656823993
NA74,-21.1674612108618,-47.8539340943098
NA75,-21.1681041028351,-47.8525887150318
NA76,-21.1687231902033,-47.8517470043153
NA77,-21.1641113832593,-47.8631810937077
NA78,-21.1642076075077,-47.8629945963622
NA79,-21.1641454976052,-47.8624742478133
NA80,-21.1641681287438,-47.8619632869959
NA81,-21.1640303302556,-47.8618131671101
NA82,-21.1643203441054,-47.8619738481939
NA83,-21.1644935142249,-47.8624430671335
NA84,-21.16614039056,-47.8614105843008
NA85,-21.1663588229567,-47.8605640120805
NA86,-21.1661714874208,-47.8602144028992
NA87,-21.1663974635303,-47.8580558951945
NA88,-21.1673695128411,-47.8629303909839
NA89,-21.1635615304113,-47.8603568114341
NA90,-21.1635311879218,-47.8603900875897
NA91,-21.1635381449014,-47.8620007541031
Chnr01,-21.1654326226562,-47.8641234710813
Chnr02,-21.1675682477653,-47.8624104615301
Chnr03,-21.1655329540372,-47.8528477996588
Chnr04,-21.1657816451043,-47.8532612789423
Chnr05,-21.1671583727002,-47.8516271430999
Chnr06,-21.1713120248169,-47.8501118626446
Chnr07,-21.1717208102346,-47.8494620136917
Chnr08,-21.1752246972174,-47.8511725086719

Chnr09,-21.1756405234337,-47.8525541815907
Chnr10,-21.172250462696,-47.850958602503
Chnr11,-21.1715717799962,-47.8519626706839
Chnr12,-21.1713249329478,-47.8519384469837
Chnr13,-21.1702300887555,-47.8518094494939
Chnr14,-21.1685894150287,-47.8631889726967
Chnr15,-21.1668543610722,-47.8578376304359
Chnr16,-21.1659078765661,-47.8570664115251
Chnr17,-21.164464680478,-47.857988588512
Chnr18,-21.1632534116507,-47.8608833625913
Chnr19,-21.16310371086,-47.8608205821366
Chnr20,-21.1648812610656,-47.8632128611207
Chnr21,-21.1651072371751,-47.8634203970433
Chnr22,-21.1675830837339,-47.8639065474272
Chnr23,-21.1687644291669,-47.8632879629732
Chnr24,-21.1696364823729,-47.8585764113814
Chnr25,-21.1693639867008,-47.8572137653828
Chnr26,-21.1696566827595,-47.8568034712226
Chnr27,-21.170046273619,-47.8563833702356
Chnr28,-21.1631267610938,-47.8585512656719
Chnr29,-21.1622845474631,-47.8592711873353
Chnr30,-21.1616548150778,-47.8605843801052
Chnr31,-21.1615346185863,-47.8605455718935
Chnr32,-21.1614884342998,-47.8606969490648
Chnr33,-21.1612871009857,-47.8612336423248
Chnr34,-21.1611707601696,-47.8611913137138
Chnr35,-21.1608143616468,-47.8595803119243
Chnr36,-21.1614450160414,-47.8593941498548
Chnr37,-21.1634611990303,-47.8571431059391
Chnr38,-21.165611576289,-47.8512279968709
Chnr39,-21.1652354802936,-47.850498687476
Chnr40,-21.1756920721382,-47.8530232328922
Chnr41,-21.1636643763632,-47.865634309128
Chnr42,-21.1639236286283,-47.8617694135756
Geneti,-21.1731612945348,-47.8610064089299
Dani,-21.1631612945348,-47.8610064089299
Melrp,-21.163161294727,-47.86100640513831
Melsp,-23.564727678895,-46.7311039008201

Rotas dos machos de suas colônias de origem identificadas até as agregações

Figura 1. As cinco agregações de machos de *Tetragonisca angustula* (Apoidea: Meliponini) em ninho-armadilha em processo de fundação. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. **R** = ninhos-armadilha que recebiam as agregações.