Sheina Koffler

Influência da quantidade de recursos alimentares e da sazonalidade sobre a produção de sexuais em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae, Meliponini)

São Paulo

2013

Sheina Koffler

Influência da quantidade de recursos alimentares e da sazonalidade sobre a produção de sexuais em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae, Meliponini)

Influence of the amount of food resources and seasonality on the production of sexual offspring in *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae, Meliponini)

São Paulo

2013

Sheina Koffler

Influência da quantidade de recursos alimentares e da sazonalidade sobre a produção de sexuais em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae, Meliponini)

Influence of the amount of food resources and seasonality on the production of sexual offspring in *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae, Meliponini)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências na Área de Ecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Astrid de Matos Peixoto Kleinert.

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Koffler, Sheina

Influência da quantidade de recursos alimentares e da sazonalidade sobre a produção de sexuais em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Apidae, Meliponini)

74 páginas.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Ecologia.

1. Abelhas sem ferrão 2. Alimento 3. Sexuais 4. Sazonalidade I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Ecologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Astrid de Matos Peixoto Kleinert

*Dedico esse trabalho ao pequeno Luis
Felipe, que nasceu e cresceu junto com
esse projeto e me dá a grande alegria de
ser sua tia.*

Agradecimentos

O mestrado foi um momento de grande aprendizado e crescimento, envolvendo muito trabalho, estudo, dificuldades, alegrias e uma variedade de sentimentos de difícil descrição, ao longo desses 27 meses. O apoio direto ou indireto de muitas pessoas foi indispensável para a conclusão desse trabalho, e aqui registro minha gratidão a todos.

Agradeço à Profa. Astrid, pela orientação e disposição em ensinar, pela paciência e compreensão. Muito obrigada por todos esses anos de orientação.

À FAPESP, pela bolsa concedida (2011/03698-3) e ao assessor do meu projeto, pelas sugestões e valiosos comentários aos relatórios.

À CAPES, pela bolsa concedida nos primeiros meses do mestrado.

Aos professores Roberto Shimizu e Tiago Franco, pela participação no meu comitê de acompanhamento. Agradeço pela enorme atenção que deram ao meu projeto e pelas importantes sugestões.

Ao Dr. Rodolfo Jaffé, por gentilmente me ajudar nas análises de dados e na discussão dos resultados, e pela grande disposição em me auxiliar em vários momentos.

À professora Michelle Manfrini, por me ensinar as ferramentas de análise de conteúdo proteico que enriqueceram meu trabalho, e à Nádia, pela grande ajuda no laboratório.

Ao Ayrton Vollet Neto e Cristiano Meneses, por compartilharem comigo os cuidados com a *Scaptotrigona*, fornecerem todas as colônias utilizadas no trabalho e pelas valiosas sugestões.

Agradeço à minha família, pelo enorme apoio, compreensão, por estarem sempre ao meu lado. Aos meus pais, Alice e Aviel, por me incentivarem sempre; ao meu irmão Aron; e ao querido Luis, que é um motivo de imensa alegria para todos nós.

Ao André, por todo o amor, companheirismo, incentivo e apoio, até nas horas de contar as abelhas. Obrigada também pelas ótimas discussões científicas e por me ajudar a não enlouquecer durante o caminho.

Aos meus avós Fify e Michel, e aos meus tios, pelo apoio e carinho. Agradeço também à minha “outra” família, Carmem, Geraldo, Renê, Fabi, Gaya e Tobias, pelos momentos alegres.

Agradeço às professoras Isa e Vera, que são grandes exemplos para mim; e ao Dr. Paulo Nogueira-Neto, por ser uma grande inspiração.

A todos os amigos e colegas do BeeLab, Cris, André, Edu, Letícia, Mari T., Guara, Cláudia, Samuel, Charles, Vanderson, Paola, Fabi, Priscilla, Hiara, Surah, Bá, Mari. Vocês tornaram os dias de trabalho muito divertidos e sempre aprendo muito com vocês, obrigada. Agradeço à Denise, pelas conversas, dicas e por me ajudar sempre que precisei, você é um grande exemplo para mim.

Agradeço aos técnicos PC (Paulo César), Patrícia, Lenilda e Geison, pela grande ajuda nesse trabalho e por me auxiliarem a quantificar as milhares de abelhas.

À Dra. Silvia Pedro, por me ensinar a identificar espécies de *Scaptotrigona*.

Agradeço à Elaine, Natália e à professora Cris Arias, pelo apoio e por poder usar os equipamentos de seu laboratório.

Aos professores Glauco e Paulo Inácio, sempre aprendo muito com vocês.

Agradeço aos professores e monitores das disciplinas e cursos que realizei durante o mestrado, foi uma grande contribuição à minha formação.

Agradeço aos meus queridos amigos da Ecologia, Érika, Renata, Thaís, Ju, Paulinha, Gabriel, Joice, Cris, Márcia, Soly, Billy e aos companheiros do Curso de Campo, que foi muito marcante.

Agradeço aos amigos biólogos Adriana, Letícia, Ivan e Diego. Às minhas queridíssimas amigas de longa data: Lais, Thaty, Vivi, Lu e Tata, vocês são incríveis. A todos os amigos da CAMBIO (Comissão Ambiental da Biologia).

A todos os funcionários do Instituto de Biociências, que ajudaram direta ou indiretamente do meu trabalho. Agradeço especialmente à Vera, pela enorme disposição em ajudar os alunos, Socorro, Bernadete e ao Luís, por consertar o meu computador nos momentos finais dessa dissertação.

Sei que para conseguir concluir esse trabalho, foi muito importante a ajuda de pessoas especiais como vocês, muito obrigada!

Índice

1. Introdução	2
2. Objetivos	10
3. Material e Métodos	
Experimento 1	11
Experimento 2	22
4. Resultados	
Experimento 1.....	26
Experimento 2.....	46
5. Discussão	
Experimento 1.....	53
Experimento 2.....	62
6. Conclusões	65
7. Resumo	68
8. Abstract	69
9. Referências bibliográficas.....	70

1. Introdução

Insetos eussociais são definidos pelo compartilhamento de três características: (1) cooperação no cuidado da prole, (2) sobreposição de pelo menos duas gerações e (3) divisão reprodutiva do trabalho, com a formação de castas em que fêmeas reprodutivas são assistidas por fêmeas parcial ou totalmente estéreis (Wilson, 1971, Oster & Wilson, 1978). O surgimento da divisão de trabalho foi um critério essencial para a evolução da eussocialidade, permitindo a existência de modos avançados da vida colonial (Oster & Wilson, 1978). Colônias de insetos sociais são formadas por várias fêmeas, entre elas a rainha e operárias, além de machos, sendo que esses indivíduos possuem papéis distintos dentro das colônias. Enquanto as operárias desempenham tarefas relacionadas à manutenção e ao crescimento da colônia (cuidado com a cria, construção e proteção do ninho, e forrageamento), machos e rainhas possuem um papel diretamente relacionado à reprodução. Dessa forma, é prevista uma demanda conflitante na alocação de recursos pela colônia entre produção de sexuais e investimento em manutenção e crescimento (produção de operárias).

Oster & Wilson (1978) discutem que o conflito entre a produção de prole sexual e operárias influencie a alocação de recursos ao longo do ciclo de vida das colônias. Em um ciclo de vida básico para colônias de insetos sociais, descrevem que a produção de reprodutivos (“fase reprodutiva”) aconteceria apenas depois do crescimento e estabelecimento da colônia (“fase ergonômica”), após a qual a colônia teria recursos suficientes para investir em reprodução. Um padrão semelhante foi descrito por um modelo baseado em seleção de parentesco, que revelou que o investimento em operárias ocorre de modo a maximizar o investimento em prole sexual ao longo da vida da colônia (Reuter & Keller, 2001). Assim, o estudo da alocação de recursos entre operárias, rainhas e machos em espécies de insetos eussociais torna-se um tema importante para a compreensão da biologia reprodutiva considerando um modo de vida social.

As abelhas sem ferrão (tribo Meliponini) são insetos eussociais que possuem distribuição nas regiões tropical e subtropical do hemisfério sul (Silveira *et al.*, 2002), com 412 espécies reconhecidas atualmente (Camargo & Pedro, 2012). Nesse grupo, dois processos relacionados à reprodução são descritos. A fundação de novas colônias ocorre por enxameagem, um processo em que um novo ninho é formado por fissão da colônia mãe. Para isso, um local é escolhido e preparado por operárias, que levam

cerume, resinas e alimento, de forma que há uma dependência da colônia filha com a colônia parental, cuja duração varia de acordo com a espécie (Michener, 1974). Diferentemente do que ocorre em abelhas do gênero *Apis*, nas abelhas sem ferrão, é a rainha virgem que se dirige ao novo ninho e dali parte para o vôo nupcial, quando ocorre o acasalamento com apenas um macho (Peters *et al.*, 1999). O outro evento relacionado à reprodução é a substituição da rainha de uma colônia, sem que ocorra a fundação de um novo ninho. Nesse caso, a rainha fisogástrica é perdida e/ou morta por operárias, sendo que uma nova rainha produzida na colônia irá substituí-la, após ser fecundada durante o vôo nupcial (van Veen & Sommeijer, 2000; van Veen *et al.*, 2004). Recentemente, demonstrou-se, em uma espécie de abelha sem ferrão, a possibilidade de parasitismo intra-específico, em que rainhas virgens de outras colônias podem invadir e se estabelecer em um ninho temporariamente órfão, que passa por um processo de substituição de rainha (*Melipona scutellaris*, Wenseleers *et al.*, 2010), sendo mais um modo possível de reprodução.

Ainda em relação à reprodução, até o momento não foram determinados quais são os fatores que influenciam a produção de sexuais em Meliponini, porém é esperada uma complexa interação entre fatores intrínsecos e extrínsecos à colônia (Bego, 1982). Alguns fatores já foram propostos e sua relação com a produção de sexuais investigada. Entre esses fatores estão: quantidade de alimento armazenado, produção de cria e tamanho populacional da colônia, presença de operárias férteis, idade da rainha fisogástrica/fase do ciclo de vida da colônia, fatores climáticos e sazonalidade. A seguir, as evidências existentes são apresentadas e discutidas a fim de se obter um quadro geral do conhecimento sobre o tema. Como no gênero *Melipona* há uma alta produção de rainhas (14 a 20% das fêmeas produzidas, Ratnieks, 2001), quando necessário, os trabalhos sobre *Melipona* serão considerados separadamente dos demais gêneros (anteriormente reunidos em “Trigonini”), em que a produção de rainhas é feita em células reais e em menor proporção (Nogueira Neto, 1997).

Quantidade de alimento

Tanto para o gênero *Melipona*, quanto para os demais gêneros, foi encontrado um efeito positivo da quantidade de alimento armazenado na colônia sobre a produção de machos e rainhas (Bego, 1990; van Veen *et al.*, 1992; Grosso *et al.*, 2000; Moo-Valle *et al.*, 2001; van Veen *et al.*, 2004; Chinh & Sommeijer, 2005). van Veen *et al.* (2004) encontraram uma correlação positiva especificamente com a quantidade de pólen

armazenado, enquanto nos demais estudos, as relações foram encontradas tanto para mel ou pólen, ou o tipo de alimento armazenado não foi discriminado pelos autores. Apenas Morais *et al.* (2006) descartaram a influência da quantidade de potes de mel e de pólen das colônias de *M. compressipes fasciculata* estudadas, embora tenham somente analisado a produção de rainhas. Apesar desse resultado, os autores discutem que colônias fortes poderiam ter utilizado mais rapidamente os recursos alimentares no aprovisionamento de células e na produção de ovos do que no armazenamento. Dessa forma, haveria uma relação da produção de rainhas com a quantidade de alimento, porém sem a necessidade de haver grandes quantidades de alimento acumuladas no ninho. Essa questão evidencia a necessidade, já levantada por Roubik (1982), de diferenciar o alimento armazenado dos recursos alimentares disponíveis no ambiente.

No entanto, os estudos acima citados não permitem estabelecer uma relação de causalidade entre a quantidade de alimento e a produção de sexuais, revelando uma carência de estudos de caráter experimental. O primeiro experimento sobre o tema foi realizado por Moo-Valle *et al.* (2001), com *Melipona beecheii*, em que colônias experimentais foram montadas com quantidades diferentes de potes de alimento (mel e pólen). O grupo com maior quantidade de potes de alimento apresentou produção de sexuais significativamente maior, fornecendo uma evidência experimental da relação entre alimento estocado e produção de machos e rainhas. No entanto, o grupo que possuía maior quantidade de alimento estocado também recebeu reforço alimentar quinzenalmente, de forma que mais de um fator foi incluído no desenho experimental, o que pode ter enviesado os resultados. Outra abordagem experimental foi realizada por Koedam *et al.* (2005), que proporcionaram uma condição de alimento excedente a duas colônias de *Melipona subnitida* (reforço de pólen com mel, em quantidade não indicada), resultando em um aumento na produção de machos (aumentos de 2,9 % para 47,2 % e 0,2 % para 25,5 %). Nesse caso, não houve um controle para a manipulação, sendo que os resultados apresentados devem ser discutidos com cautela. Dessa forma, a manipulação experimental ainda parece uma proposta interessante para a investigação do tema.

Produção de cria e tamanho populacional da colônia

Para *Melipona favosa*, foi verificada uma relação positiva entre a proporção de machos e rainhas e a proporção de operárias nos favos de cria, sugerindo uma relação entre a produção de sexuais e o tamanho populacional (Koedam 1999). Isso poderia

indicar que colônias que possuem grande quantidade de operárias poderiam arcar com os custos da produção de machos e rainhas, sem prejudicar o desenvolvimento da colônia, como proposto por Oster & Wilson (1978). O mesmo foi encontrado para *Scaptotrigona postica* (*S. aff. depilis*) (Bego, 1990), onde a produção de machos foi positivamente relacionada ao aumento da população das colônias, e para *Melipona bicolor*, em que o número de rainhas produzidas foi correlacionado positivamente com o número de operárias (Alves, 2004). Porém, van Veen *et al.* (2004) observaram, para *Melipona beecheii*, uma relação negativa entre população de cria e de adultos e a produção de machos e rainhas, embora não tenham apresentado nenhum teste de significância. Nesse sistema, a dinâmica de produção de cria e produção de sexuais parece ser mais influenciada pela dinâmica de disponibilidade dos recursos florais durante o ano, o que será discutido adiante.

Presença de operárias férteis

Sabe-se que, além da rainha, operárias de várias espécies de abelhas sem ferrão podem botar ovos funcionais, que darão origem a machos (Tóth *et al.*, 2004). Dessa forma, a produção de machos na colônia pode ser influenciada pela presença de operárias férteis e sua quantidade no ninho. Em seu extenso estudo com *S. aff. depilis*, Bego (1990) verificou uma maior frequência de operárias com ovos funcionais nos ovários e um aumento da oviposição desses ovos no interior de células de cria por operárias durante fases com produção de machos nas colônias. Porém, com uma espécie do mesmo gênero, *Scaptotrigona aff. postica*, Luz *et al.* (2011) verificaram que as colônias possuíam frequências semelhantes de operárias com ovários ativados, independentemente de haver ou não produção de machos. Trata-se de outra questão em aberto, sendo que mais estudos são necessários para compreender esse tema.

Idade da rainha fisogástrica e fase do ciclo de vida da colônia

Nos estudos já realizados, ainda não foi demonstrado haver correlação entre a idade da rainha e a produção de machos e novas rainhas nas colônias de abelhas sem ferrão (*S. aff. depilis*: Bego, 1990; *M. compressipes*: Moraes *et al.*, 2006). No entanto, nenhum estudo até o momento testou essa relação de forma sistematizada. Ao final da vida da rainha, ou seja, na fase final do ciclo de vida da colônia, o aumento no investimento em sexuais consistiria em uma estratégia vantajosa, porém, apenas algumas evidências pontuais foram descritas. Um aumento da produção de machos por

operárias foi verificado em uma colônia de *Friesella schrottkyi* durante um evento de enxameagem (Imperatriz-Fonseca & Kleinert, 1998) e durante o processo de substituição de rainha em uma colônia de *Plebeia remota* (Sousa & Kleinert, 2006). Para *Tetragonisca angustula*, foi observada uma alta produção de células reais em colônias com rainhas recém-estabelecidas (observação pessoal) e um alto investimento em machos e rainhas em uma colônia com rainha mais velha, que foi posteriormente substituída (Koffler & Kleinert, 2011). Essas evidências sugerem que o estudo do investimento em reprodutivos, durante o ciclo de vida da colônia, pode trazer contribuições importantes para a compreensão da regulação da produção de sexuais.

Fatores climáticos e sazonalidade

O efeito de fatores climáticos parece diferir entre as espécies estudadas. Em *Melipona beecheii* (Costa Rica), nos meses com fortes chuvas, a porcentagem de machos produzidos foi menor, sendo que em um dos meses não houve registro de produção (van Veen *et al.*, 2004). Já para *Trigona (Lepidotrigona) ventralis flavibasis* (Vietnã), a maior produção de machos ocorreu na estação chuvosa e foram encontradas correlações positivas entre fatores climáticos (temperatura e pluviosidade) e a produção tanto de machos quanto de rainhas (Chinh & Sommeijer, 2005). Para *Scaptotrigona postica* (*S. aff depilis*) (Ribeirão Preto, Brasil), não foi encontrada correlação entre a produção de machos e fatores climáticos, como temperatura, pluviosidade e umidade relativa do ar (Bego, 1982).

Quanto à existência ou não de uma regulação temporal da produção de sexuais em Meliponini (sazonalidade), os estudos, até o momento, apresentaram resultados contrastantes. van Veen *et al.* (2004) afirmam que a ausência de um ciclo sazonal claro nos trópicos pode ser uma das razões para que a produção de machos não seja limitada a um período particular.

Em relação à produção de machos e rainhas em *Melipona*, foi encontrada variação sazonal em *Melipona beecheii* (México: Moo-Valle *et al.*, 2001; Costa Rica: van Veen *et al.*, 2004), em *Melipona favosa* (Trindade e Tobago, Sommeijer *et al.*, 2003) e apenas para a produção de rainhas em *Melipona bicolor* (São Paulo, SP; Alves, 2004). Em *M. compressipes*, a produção de rainhas apresentou variação sazonal marginalmente significativa, mas vale ressaltar que foram utilizadas colônias do Maranhão, estabelecidas em Ribeirão Preto, SP (Morais *et al.*, 2006). No entanto, algumas variações são observadas dentro da mesma espécie. Moo-Valle *et al.* (2001)

encontraram machos o ano todo em *Melipona beecheii*, enquanto van Veen *et al.* (2004), estudando a mesma espécie, encontraram épocas do ano com ausência de machos nas colônias. Já para *Melipona favosa*, os resultados são ainda mais divergentes, pois em um estudo foi observada variação sazonal (Sommeijer *et al.*, op. cit), enquanto em outro estudo, no mesmo local, não houve variação (Chinh *et al.*, 2003). Mesmo quando foi encontrada variação sazonal, a produção de rainhas parece ser mais constante ao longo do ano do que a produção de machos (Roubik, 1982; Moo-Valle *et al.*, 2001; van Veen *et al.*, 2004).

Nos demais gêneros de abelhas sem ferrão, também é encontrada uma grande variação. Em *Tetragonisca angustula angustula* (Ribeirão Preto, SP), Grosso *et al.* (2000) sugerem que os machos sejam produzidos no final do verão, embora Bego (*apud* Grosso *et al.*, 2000) tenha encontrado machos durante o inverno em grandes colônias. Para *T. ventralis*, foi encontrado um efeito sazonal na produção de sexuais, porém com machos presentes o ano todo no nível populacional (Vietnã: Chinh & Sommeijer, 2005). Não foi registrada variação sazonal e machos foram encontrados o ano todo para *Plebeia droryana* (São Paulo: Cortopassi-Laurino, 1979), *Plebeia remota* (São Paulo: van Benthem *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 2009) e *S. aff. depilis* (Ribeirão Preto: Bego, 1982). Apesar de não haver variação na produção de machos entre os meses do ano, *Plebeia remota* apresenta um intervalo de diapausa reprodutiva em que ocorre redução e ausência de atividade de construção de células de cria (van Benthem *et al.*, 1995), sendo que nos meses anteriores e posteriores à diapausa, são observadas as menores frequências de machos (Alves *et al.*, 2009). Assim como para *Melipona*, a produção de rainhas parece oscilar menos do que a produção de machos (Chinh & Sommeijer, 2005).

Tanto para *Melipona*, quanto para os demais gêneros, a produção de machos em uma colônia parece restrita a curtos períodos (*Male-Producing Periods*, Velthuis *et al.*, 2005). No entanto, no nível populacional, a produção de machos é observada o ano todo, com a contribuição de várias colônias da população (Bego, 1982;; Sommeijer *et al.*, 2003; Alves, 2004; Chinh & Sommeijer, 2005). Além disso, no nível da população também há uma correlação positiva entre a produção de machos e rainhas, o que pode sugerir que sejam sincrônicas (Bego, 1990; van Veen *et al.*, 2004; Chinh & Sommeijer, 2005; Morais *et al.*, 2006). Analisando a correlação entre machos e rainhas, Koedam (1999) e Alves (2004) encontraram resultados positivos, porém isso não observado por Moo-Valle *et al.* (2001).

De acordo com o contexto descrito acima, nota-se a complexidade do tema, visto que os fatores que podem influenciar a produção de sexuais são bastante relacionados, dificultando a análise de cada variável em separado. Por exemplo, a produção de machos e rainhas pode ser influenciada pela quantidade de alimento estocado no ninho e também variar ao longo do ano (sazonalidade). A variação ambiental sazonal, por sua vez, tem um efeito importante sobre a quantidade de alimento disponível para as colônias (van Veen *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2012), sendo que alimento e sazonalidade são dois fatores com alta interação. Assim, muitas vezes é difícil concluir se a produção de sexuais foi afetada primariamente pela quantidade de alimento ou pela sazonalidade, ou por ambas igualmente.

A fim de compreender melhor o efeito da quantidade de alimento na produção de indivíduos reprodutivos, é essencial entender o fluxo dos recursos alimentares na colônia e diferenciar o efeito dos recursos disponíveis no ambiente dos recursos armazenados na colônia. Roubik (1982) atesta que a flutuação do alimento armazenado na colônia reflete o consumo e aquisição de alimento. Os diferentes consumos podem ser resumidos da seguinte forma: somente operárias novas consomem pólen, adultos consomem mel para promover sua atividade de forrageio e seu metabolismo, mel e pólen são necessários para produção de cera (Roubik, 1982) e para o provisionamento de células de cria. Dessa forma, o autor conclui que, a não ser que colônias sejam estáveis e tenham igual distribuição etária, a dinâmica do alimento armazenado será diferente.

Quanto ao estudo dos fatores temporais, sabe-se que as populações estão expostas a mudanças ambientais regulares ou sistemáticas na qualidade e abundância dos recursos (Fretwell, 1972). Essas mudanças cíclicas podem se apresentar com períodos anuais de repetição, o que leva a uma importante característica: a previsibilidade de sua ocorrência (Tauber *et al.*, 1986). Dessa forma, espera-se que os organismos apresentem ritmos anuais de atividade, como reprodução, que beneficiem seu desempenho em épocas mais ou menos favoráveis. O efeito da sazonalidade na reprodução pode ser investigado pela variação da produção de sexuais ao longo do ano. Porém, até o momento, os estudos realizados com abelhas sem ferrão revelam grande variação entre espécies, e para uma mesma espécie, sendo que a diferença entre as condições das colônias é frequentemente apontada como um possível fator de interferência. Assim, um aprofundamento no tema, partindo de um conjunto de colônias com condições semelhantes, se faz necessário.

Tanto em relação ao efeito da quantidade de alimento, como à sazonalidade, estudos experimentais trariam contribuições interessantes para a compreensão da produção de sexuais nas abelhas sem ferrão. No entanto, são escassos os trabalhos que envolvem alguma manipulação experimental (Moo-Valle *et al.*, 2001; Koedam *et al.*, 2005), sendo que a maior parte dos estudos já citados possuem caráter descritivo. Dado que existe uma demanda conflitante entre a produção de sexuais e o crescimento das colônias, um estudo que investigasse experimentalmente o efeito da quantidade de alimento e da sazonalidade nas colônias poderia contribuir para a compreensão de como as colônias regulam a alocação de recursos sob a oscilação das condições ambientais e internas da colônia.

2. Objetivos

O objetivo desse estudo foi investigar a influência da disponibilidade de recursos alimentares e estações do ano contrastantes (verão e inverno) sobre a produção de sexuais em uma espécie de abelha sem ferrão. A questão principal foi determinar se a produção de sexuais era influenciada pela disponibilidade de recursos alimentares e pela sazonalidade.

As hipóteses e previsões específicas foram:

1) Quantidade de recursos alimentares.

Em relação à quantidade de recursos alimentares, a hipótese previa que a disponibilidade de recursos alimentares afetaria diretamente a produção de sexuais: em condições de maior quantidade de alimento, deveria haver maior produção de machos e rainhas; já em condições de pouco alimento, a produção de machos e rainhas deveria ser menor.

Também foi testada a hipótese de que a disponibilidade de alimento afeta diretamente a capacidade reprodutiva das operárias. Nesse caso, esperava-se que, em condições com maior quantidade de alimento, fosse encontrada maior frequência de operárias com ovários ativados.

2) Sazonalidade (verão e inverno).

Em relação à sazonalidade, a hipótese previa que haveria uma regulação temporal da produção de sexuais, ou seja, haveria um intervalo determinado em que ocorreria produção de machos e novas rainhas, ou em que esta produção ocorreria em maiores proporções. Assim, era esperado que a produção de indivíduos reprodutivos fosse maior no verão e menor, ou ausente, no inverno, estação aparentemente menos favorável para a reprodução. De acordo com os estudos já realizados, esperava-se que a produção de rainhas oscilasse menos que a produção de machos.

3. Material e Métodos

Para investigar as questões explicitadas acima, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, a questão da quantidade de recursos alimentares foi abordada simulando diferentes disponibilidades de alimento por meio da alimentação artificial das colônias. Também foi abordada a questão da sazonalidade, testando duas estações do ano contrastantes (verão e inverno). A partir dos resultados do primeiro experimento, foi proposto o segundo experimento, em que a questão da quantidade de recursos alimentares foi abordada por meio da manipulação do alimento armazenado nas colônias.

3.1. Experimento 1: Alimento disponível à colônia e Sazonalidade

3.1.1. Escolha e descrição da espécie estudada

Para o estudo, foi selecionada a espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis*, por apresentar colônias populosas e bastante resistentes à manipulação, e por haver produção de machos por operárias. O gênero *Scaptotrigona* compreende complexos de difícil separação e apresenta um grande número de espécies a serem descritas, inclusive a espécie escolhida para esse estudo (Silveira *et al.*, 2002). A distribuição geográfica desse gênero se estende pela região neotropical, sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai (Camargo & Pedro, 2012).

A construção de células de cria no gênero ocorre de modo sucessivo, ou seja, células em diferentes estágios de construção são encontradas ao mesmo tempo; o aprovisionamento pode ser sucessivo ou sincrônico; e a postura ocorre exclusivamente agrupada (a rainha oviposita em uma série de células de uma vez) (Zucchi *et al.*, 1999). Além de ovos férteis, é observada a presença de ovos tróficos colocados por operárias (Beig, 1972).

O primeiro relato de oviposição de ovos férteis por operárias em *Scaptotrigona aff. depilis* (*S. postica*) foi feito por Beig (1972). Diferentemente do que ocorre em outras espécies, esse comportamento, bem como o desenvolvimento dos ovários das operárias, parecem ser frequentes (Bego, 1982). Estudos prévios indicam que é comum encontrar células recém-operculadas com dois ovos em seu interior, o que é atribuído à oviposição da rainha, seguida por oviposição de operária na mesma célula (Beig, 1972; Bego, 1982).

Bego (op.cit.) observou que a produção de machos na espécie ocorre o ano todo, porém com alta variação entre colônias. Nesse estudo, algumas colônias apresentaram produção de machos ininterrupta, enquanto outras apresentaram machos em alguns meses apenas. Em relação à maternidade dos machos produzidos, análises moleculares, por *loci* de microssatélites, atribuíram 13% dos machos encontrados à produção por operárias (Paxton *et al.*, 2003).

3.1.2. Obtenção e manutenção das colônias

Doze colônias de *Scaptotrigona* aff. *depilis* mantidas no meliponário da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (USP Ribeirão Preto) foram trazidas para o Laboratório de Abelhas (IB-USP), em fevereiro de 2011. Previamente, algumas operárias de cada colônia foram coletadas e a identificação da espécie foi confirmada. Essas colônias foram mantidas na área externa no laboratório e, periodicamente, receberam reforço alimentar de xarope de açúcar (1:1 v/v) para auxiliar em seu estabelecimento e manutenção. Após alguns meses de aclimação, verificou-se que as colônias estavam fortes, com população numerosa e grande reserva de alimento. As colônias que apresentaram crescimento mais lento receberam, ocasionalmente, reforço alimentar de pólen comercial apícola.

Devido à necessidade de um número maior de colônias para a realização do experimento, entre o final de setembro e início de outubro de 2011, cinco colônias foram divididas a fim de aumentar o número de colônias disponíveis. Para essa divisão, uma colônia recebeu quatro ou cinco favos de cria em estágio avançado de desenvolvimento, potes de alimento, operárias e a rainha fisogástrica, enquanto a outra colônia permaneceu com o restante, garantindo-se que os favos remanescentes apresentassem ao menos uma célula real, para o estabelecimento de uma nova rainha. As divisões foram realizadas com sucesso, resultando em um total de 17 colônias no laboratório.

3.1.3. Montagem das colônias experimentais

Verão

Para o experimento, no início de dezembro de 2011, foram selecionadas quinze colônias que se apresentavam mais fortes e, a partir dessas, montadas colônias experimentais padronizadas, com o objetivo de diminuir o efeito da heterogeneidade entre as colônias. Cada colônia selecionada originou apenas uma colônia experimental,

havendo apenas mistura dos potes de alimento de colônias diferentes, quando necessário. Cada colônia experimental recebeu de 8 a 10 favos de cria em diferentes estágios de desenvolvimento; uma quantidade padronizada por volume de potes de alimento (principalmente pólen), de forma que toda a base da caixa fosse ocupada por favos de cria e potes de alimento; um mesmo volume de abelhas adultas ($V = 34 \text{ cm}^3$, coletadas com um sugador entomológico) e a rainha fisogástrica da colônia. Pelo grau de desgaste alar, foi identificado que as rainhas apresentavam idades aproximadamente semelhantes. Todas as rainhas não apresentavam desgaste alar ou apresentavam apenas um leve desgaste na borda distal da asa, indicando que eram rainhas novas. Inicialmente, as rainhas foram marcadas no tórax com tinta, para identificação individual, de modo que uma possível substituição da rainha pudesse ser detectada. No entanto, logo após a marcação, as rainhas conseguiam retirar a marca de tinta e o procedimento foi abandonado.

Após a montagem, as colônias experimentais foram mantidas fechadas, em caixas com termostato, com temperatura mínima controlada em 28°C . Porém, a caixa com termostato passou a acumular umidade, além de dificultar a manipulação das colônias, sendo que, após os primeiros dias, esse aparelho foi retirado do ambiente do experimento. Nenhum outro tipo de controle da temperatura foi realizado. Dentro do laboratório, um *data logger* foi programado para coletar a temperatura periodicamente.

Nas duas semanas subsequentes à montagem, as colônias permaneceram sem acesso ao meio externo e receberam alimentação artificial (xarope de açúcar e água 1:1 e pólen apícola hidratado), periodicamente. Nesse intervalo, foi quantificado o consumo do alimento disponibilizado, permitindo definir as quantidades de alimento que seriam utilizadas nos tratamentos experimentais.

Inverno

O mesmo procedimento de montagem das colônias no verão foi adotado no experimento de inverno, com exceção do número de favos de cria, que variou de 7 a 10 favos, pois havia colônias mais fracas, com poucos favos disponíveis. As rainhas fisogástricas também foram classificadas como novas, pois apresentaram nenhum ou pouco desgaste na borda distal das asas. Inicialmente, planejou-se utilizar as mesmas colônias nos dois experimentos, o que permitiria uma comparação pareada entre as estações. No entanto, isso não foi possível, visto que várias colônias morreram no primeiro experimento. No total, foram montadas quinze colônias padronizadas, sendo

que cinco colônias já haviam sido utilizadas no experimento realizado no verão. Em casos de perda de colônias, novas colônias foram montadas para substituí-las, seguindo o mesmo padrão estabelecido. A montagem das colônias foi realizada em junho de 2012 e, após o procedimento, as colônias permaneceram sem acesso ao meio externo por três semanas, recebendo alimentação artificial na mesma quantidade (100ml de xarope de açúcar e 8g de pólen apícola hidratado). Dados de temperatura também foram coletados por meio de um *data logger* programado no interior do laboratório durante os meses de experimento.

3.1.4. Descrição do experimento

Verão

As colônias foram submetidas a cinco tratamentos experimentais, resultado de uma combinação de fatores de confinamento e diferentes quantidades de alimento fornecido (Tabela 1). Os grupos experimentais A1 e C1 receberam uma quantidade de alimento correspondente ao valor necessário para a manutenção das colônias em confinamento. Essa quantidade foi definida a partir do consumo das colônias previamente ao experimento, enquanto permaneciam fechadas, perfazendo 105 ml de xarope de açúcar e 7 g de pólen, por semana. Os grupos A2 e C2 receberam o dobro dessa quantidade de alimento (210 ml de xarope de açúcar e 14 g de pólen, por semana). Tanto o açúcar quanto o pólen utilizados foram adquiridos uma única vez e de um mesmo fabricante, para cada experimento realizado, a fim de padronizar a alimentação fornecida durante o experimento. Parte do alimento foi fornecida em uma caixa anexa, conectada entre a caixa da colônia e o tubo para o meio externo. O alimento foi fornecido três vezes durante a semana, em intervalos adequados para o consumo pelas abelhas. Além da troca de alimento, semanalmente, o lixo acumulado foi retirado e foi fornecida água às colônias (2ml), uma manutenção criada principalmente para as colônias confinadas. No entanto, o fornecimento de água foi interrompido logo no início do experimento, pois o recurso não parecia ser coletado pelas abelhas.

Os grupos com o mesmo tipo de alimentação diferiam entre si quanto à condição de acesso ao meio externo, sendo que as colônias dos grupos C1 e C2 permaneceram confinadas, ou seja, sem acesso ao meio e consumindo apenas o alimento fornecido. As colônias dos grupos A1 e A2 permaneceram com acesso ao meio e, portanto, além do alimento fornecido, podiam forragear livremente. O grupo A0 (controle) não recebia alimentação artificial e também permanecia com acesso ao meio. Todas as colônias

foram conectadas ao exterior do laboratório com um tubo plástico transparente. Para as colônias confinadas, esse tubo possuía a extremidade fechada com uma tela metálica, que impedia a saída das abelhas, como em Oda *et al.* (2007). Esse procedimento tem como objetivo isolar a colônia de outros fatores externos que não os relacionados ao alimento e, ao mesmo tempo, permitir que as abelhas tenham acesso ao ciclo de claro-escuro diário, bem como às variações de fotoperíodo ao longo dos dias de confinamento.

Tabela 1. Tratamentos dados aos grupos A2, C2, A1, C1 e A0 (controle) quanto a acesso ao ambiente externo e alimentação. No experimento de verão, todos os tratamentos experimentais foram realizados, enquanto, no experimento de inverno, foram realizados apenas os tratamentos com colônias com acesso ao ambiente (grupos A2, A1 e A0). As colônias sublinhadas foram utilizadas tanto no experimento do verão, como no experimento do inverno.

Grupo	Acesso ao ambiente	Alimentação (semanal)	Colônias verão	Colônias inverno
A2	Com acesso	210 ml de xarope de açúcar e 14 g de pólen	<u>1</u> , <u>2</u> e 3	<u>13</u> , 16, 17, 18 e 19
C2	Sem acesso	210 ml de xarope de açúcar e 14 g de pólen	4, 5 e 6	-
A1	Com acesso	105 ml de xarope de açúcar e 7 g de pólen	7, 8 e <u>9</u>	<u>1</u> , <u>2</u> , 20, 21, e 22
C1	Sem acesso	105 ml de xarope de açúcar e 7 g de pólen	10, 11 e 12	-
A0 (controle)	Com acesso	Sem alimentação artificial	<u>13</u> , <u>14</u> e 15	<u>9</u> , <u>14</u> , 23, 24 e 25

A fim de compor os grupos de maneira aleatória foi realizado um sorteio. Apesar de as colônias experimentais serem padronizadas, após as duas primeiras semanas de manutenção no laboratório, verificou-se variação no desenvolvimento das colônias, observada principalmente em relação à produção de células de cria. Para que essa diferença não afetasse a composição dos grupos e, com isso, provocasse uma variação interna aos grupos maior que a variação esperada ao acaso, foi necessário realizar um sorteio estratificado considerando essas variações. Dessa forma, as colônias foram classificadas de acordo com o diâmetro dos favos produzidos (maior diâmetro: cerca de

700 células, menor diâmetro: cerca de 400 células) e de acordo com o histórico de a colônia original ter ou não passado por divisão da colônia. Dessa classificação, resultaram três categorias com cinco colônias cada: (a) colônias com favos de maior diâmetro e que não passaram por divisão de colônia, (b) colônias com favos de maior diâmetro e que passaram por divisão da colônia e (c) colônias com favos de menor diâmetro e que passaram por divisão da colônia. Por meio do sorteio, cada grupo experimental foi composto por uma colônia de cada categoria, formando grupos mais homogêneos entre si. O tratamento experimental iniciou-se no final de dezembro de 2011 e foi mantido até o final de março de 2012, estendendo-se pela estação do verão.

Inverno

Como no verão o tratamento de confinamento das colônias não teve resultados positivos, resultando na perda de várias colônias, esse fator foi excluído do experimento realizado no inverno. Dessa forma, foi testado apenas o efeito da quantidade de alimento fornecido às colônias com acesso ao meio externo (grupos A2, A1 e A0), com cinco colônias em cada grupo (Tabela 1). As quinze colônias foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos, por meio de um sorteio. Visto que as colônias não apresentaram grande variação, foi realizado apenas um sorteio, sem estratificações. A fim de se fazer uma análise em longo prazo, foi proposto manter o experimento além da estação do inverno, porém, como houve perda de colônias, o experimento foi mantido por quatro meses apenas, se estendendo do meio do mês de julho a novembro de 2012.

3.1.5. Coleta de dados

a) Crescimento das colônias: construção de células de cria

Em cada mês, a construção de células de cria foi acompanhada durante quatro, cinco ou sete dias, de forma a se analisar o desenvolvimento das colônias. Para isso, a cada dia, os favos foram mapeados por meio de desenhos em uma folha com *grid* de hexágonos ou por fotografias dos favos e posterior contagem das células construídas. Para cada colônia, foi calculada a média de células construídas no intervalo, descartando-se os casos específicos em que a colônia estava órfã e não havia construção de novas células. Segundo a proposta inicial, esse procedimento seria realizado diariamente, porém, mostrou-se bastante estressante para as colônias, já que a cada inspeção, era necessário abrir a colônia para visualizar a área da cria e retornar à colônia

as abelhas que escapassem. Portanto, optou-se por realizar apenas essa amostragem mensal da construção de células de cria, durante alguns dias.

b) Produção de operárias, machos e rainhas

A produção de operárias, machos e rainhas foi quantificada por meio da coleta de favos de cria com abelhas prestes a emergir. Operárias e machos de abelhas sem ferrão são produzidos em células semelhantes, de forma que é necessário inspecionar cada célula a fim de verificar a frequência de machos em cada favo. Inicialmente, planejava-se realizar o procedimento desenvolvido por Koedam (2003) e modificado por Alves (2004), em que as células são desoperculadas e é possível diferenciar operárias e machos pelo formato dos olhos compostos. No entanto, em testes iniciais prévios, essa técnica não se mostrou adequada, pois ao devolver os favos analisados à colônia, as operárias mais velhas matavam as pupas, mesmo quando as células eram recobertas com cerume. Assim, optou-se por coletar os favos e aguardar a emergência das abelhas (procedimento semelhante ao realizado por Bego, 1982). Após a emergência, cada indivíduo foi identificado quanto ao gênero, operária ou macho, e devolvido à colônia de origem. Durante esse processo, verificou-se certa mortalidade, sendo que, em média, 28% das abelhas de cada favo morreram no verão, e 19% no inverno. Além de operárias e machos, também foi quantificada a presença de células reais por favo e confirmada a presença de rainhas virgens ou machos gigantes em seu interior. Essa confirmação não foi possível nos casos em que o indivíduo presente na célula morreu na fase de larva ou foi perdido devido ao rompimento da célula durante a coleta do favo.

Inicialmente, pretendia-se inspecionar todos os favos de cria produzidos por colônia. Porém, o novo procedimento em que se aguardava a emergência dos indivíduos demandou um tempo maior para análise, de forma que também foi necessário recorrer a uma amostragem. Assim, foram coletados favos intercalados, de modo que 50% dos favos produzidos foram analisados para cada colônia.

Durante o experimento, verificou-se a produção de rainhas miniaturas, bem como de machos gigantes. Esses indivíduos, em conjunto com outros semelhantes obtidos fora do experimento, foram medidos utilizando-se um estereomicroscópio com uma linha graduada acoplada à lente objetiva. Para comparação, também foram medidos rainhas virgens e machos normais. As medidas realizadas foram: distância intertegular,

largura máxima da cabeça e distância interorbital (utilizando como referência a base da antena).

c) Potes de alimento

A contagem dos potes de alimento (mel e pólen) foi realizada apenas no experimento de inverno. Para isso, mensalmente, os favos de cria foram removidos, a fim de visualizar a área de construção dos potes de alimento e foi tirada uma fotografia, para posterior quantificação dos potes. No verão, apenas foram registradas as colônias que apresentaram grande quantidade de potes, observação realizada durante as manipulações para alimentação das colônias e coleta de favos.

d) Ativação dos ovários de operárias

Para a análise de ativação dos ovários das operárias, mensalmente, foram coletadas operárias na área de cria de cada colônia. No verão, essas operárias foram mortas por resfriamento e fixadas em álcool 70%. Porém, a fixação não foi realizada com sucesso e não foi possível proceder com a dissecação das operárias coletadas nessa estação. No inverno (setembro a outubro), as operárias coletadas foram apenas mantidas em freezer para análise posterior, sem haver fixação. Das amostras coletadas, 20 operárias foram sorteadas para a dissecação. A classificação dos ovários utilizada foi a proposta por Bego (1982) (Fig. 1), porém sem classificar os ovos em funcionais e férteis. Os ovários que não foram visualizados durante a dissecação, foram classificados como classe A (início da ativação); os ovários da classe B, como não ativados e os ovários das classes C, D₁, D₂, D₃ e E, por apresentarem ovos em estágio avançado de desenvolvimento e com menor probabilidade de degeneração, foram considerados ativados.

Figura 1. Classes de ativação dos ovários de operárias (retirado de Bego, 1982). F: ovos funcionais; N: ovos nutritivos (tróficos). Nesse trabalho, foram considerados ativados os ovários das classes C, D₁, D₂, D₃ e E,

e) Quantidade de proteínas totais na hemolinfa de operárias e no pólen estocado

Para verificar a condição nutricional das operárias dos diferentes grupos, as proteínas totais presentes na hemolinfa das operárias. Esse método é bastante empregado na avaliação de dietas proteicas em *Apis mellifera* (Cremonez *et al.*, 1998; Cappelari, *et al.*, 2009, Morais *et al.*, *in press*), sendo que nesse trabalho, a técnica foi adaptada para a avaliação de dietas quantitativamente diferentes em uma abelha sem ferrão. Para isso, a partir das amostras de favos de cria retirados das colônias (item b), 20 operárias, com 1 a 4 dias de vida, foram selecionadas ao acaso. Essas operárias foram anestesiadas em gelo e as amostras de hemolinfa foram coletadas cortando-se a base das asas (tégulas) e pressionando o tórax da operária até que fosse possível extrair uma gota de hemolinfa, com uma pipeta. Após a coleta, as amostras de hemolinfa de cada colônia foram centrifugadas e armazenadas em freezer (-20°C). Esse procedimento foi realizado mensalmente, apenas no experimento de inverno, nos meses de setembro a

novembro. A quantidade de proteínas foi analisada pelo método de Bradford (1976), em espectrofotômetro (595nm), utilizando curva padrão de albumina sérica bovina.

O pólen estocado nas colônias experimentais também foi analisado em relação à quantidade de proteínas totais presentes em relação à massa seca do pólen. Para isso, mensalmente amostras de pólen foram coletadas. De cada colônia, dois potes de pólen aparentemente em consumo pelas abelhas foram amostrados com o auxílio de um canudo plástico que foi inserido até o fundo do pote, de modo a coletar pólen em toda sua altura. O pólen coletado foi seco em estufa e armazenado em temperatura ambiente. Para realizar a análise, 1mg de cada amostra foi macerado com pó de alumínio em 500µL solução de NaOH (0,1M), para liberação do conteúdo proteico dos grãos de pólen. Essa amostra foi mantida em temperatura de 4°C por 72h e posteriormente fervidas por 5 minutos e centrifugadas (Paulino-Neto *et al.*, 2010). A análise da quantidade de proteínas seguiu o mesmo protocolo descrito para a análise da hemolinfa.

3.1.6. Análise estatística

Variáveis analisadas

As seguintes variáveis foram analisadas: número médio de células de cria produzidas por dia, número total de células de cria, número total de favos, número total de operárias, número total de machos, frequência relativa de machos, número total de células reais, número médio de potes de mel, número médio de potes de pólen, número de operárias com ovários ativados e quantidade de proteínas na hemolinfa (µg/µl). A produção de machos foi analisada separadamente por meio do número absoluto e da frequência relativa, por terem significados biológicos diferentes. Por exemplo, colônias com um mesmo número absoluto de machos podem apresentar frequências relativas bastante diferentes, o que pode ser importante para compreender a alocação de recursos na produção dos indivíduos da colônia. No caso das células reais, a análise foi realizada apenas com o valor absoluto, pois a espécie estudada produz poucas células reais por favo de cria, de forma que a frequência relativa não seria muito informativa. A produção de rainhas foi analisada indiretamente por meio do número de células reais, pois, em alguns casos, não foi possível confirmar a presença de uma rainha ou de um macho gigante na célula (ver item 3.1.5.b). Porém, a maior parte das células reais analisadas continha rainhas, de forma que o número de células reais deve ser um bom indicador do número de rainhas produzidas.

Testes estatísticos empregados

Verão

Visto que o delineamento experimental proposto para o verão resultava em um desenho incompleto (pois não seria possível ter um grupo que não recebesse alimento e fosse confinado), a análise estatística foi realizada em duas etapas. Inicialmente, verificou-se o efeito da quantidade de alimento nos grupos com colônias abertas (A2, A2 e A0), aplicando-se uma ANOVA ou um teste de Kruskal-Wallis, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias. A normalidade da distribuição foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variância pelo teste de Levene. Antes de recorrer ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, a variável foi transformada em $\log_{10}$ e foi verificada a possibilidade de se empregar o teste paramétrico, sendo esse teste preferido, sempre que possível. Na sequência, para verificar o efeito dos tratamentos de confinamento e quantidade de alimento, bem como a interação desses fatores sobre as variáveis analisadas, foram analisados os grupos A2, A1, C2 e C1 (excluindo-se o grupo controle A0). Os testes utilizados foram ANOVA bifatorial ou o teste de Kruskal-Wallis estendido (Scheirer-Ray-Hare) (Sokal & Rolf, 1995), novamente de acordo com a normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias. Também foi empregada a transformação da variável para $\log_{10}$, a fim de se manter a utilização do teste paramétrico. Em todos os testes, o nível de significância foi de 5%. Quando houve um efeito significativo de um fator, foram empregados os testes de Tukey, no caso da ANOVA, ou Mann-Whitney, no caso do teste de Kruskal-Wallis. No caso do teste de Kruskal-Wallis estendido para dois fatores, utilizou-se o teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni, de acordo com o número de comparações realizadas.

Para verificar a variação conjunta das variáveis, utilizou-se a correlação paramétrica de Pearson. Quando necessário, as variáveis foram transformadas para $\log_{10}$ e o nível de significância foi de 5% (Zar, 1999).

Inverno

Para verificar o efeito da quantidade de alimento sobre as variáveis analisadas, foi realizado o mesmo procedimento adotado no experimento de verão. Para verificar a variação conjunta das variáveis, utilizou-se a correlação paramétrica de Pearson e, quando necessário, as variáveis foram transformadas para $\log_{10}$. A fim de determinar as

principais variáveis responsáveis pela variação das variáveis dependentes de interesse, foi realizada uma regressão linear múltipla, a partir das correlações significativas encontradas previamente. Para comparar a variação na quantidade de proteínas na hemolinfa das operárias entre os meses de setembro e outubro, foi empregado o teste t pareado (Zar, 1999). Em todos os testes, o nível de significância foi de 5%.

Verão e Inverno

Para verificar se havia diferença nas variáveis estudadas entre as estações do ano estudadas, os dados referentes a número de células de cria construídas, número de favos de cria, número de operárias, número de machos, frequência relativa de machos e número de células reais foram comparados entre as estações. No conjunto de dados do inverno, foram utilizados apenas os dados dos três primeiros meses, que correspondiam à estação propriamente dita. Como não houve grupos confinados no experimento de inverno, a comparação entre estações foi realizada utilizando-se apenas os grupos com colônias mantidas com acesso ao meio externo. Dessa forma, avaliou-se o efeito das estações no ano, considerando os tratamentos referentes à quantidade de alimento. Para isso, foi aplicada uma ANOVA bifatorial ou o teste de Kruskal-Wallis estendido (Scheirer-Ray-Hare) (Sokal & Rolf, 1995), novamente de acordo com a normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias. A normalidade da distribuição foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variância pelo teste de Levene. Em todos os testes, o nível de significância foi de 5%.

3.2. Experimento 2: Manipulação do alimento armazenado

3.2.1. Descrição do experimento

Para o experimento, foram utilizadas nove colônias de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. Dessas, seis colônias já se encontravam na área externa do Laboratório de Abelhas, sendo originadas das divisões de colônia realizadas para a montagem do Experimento 1 (inverno). Embora bastante recentes (cerca de quatro meses após a divisão), as colônias estavam bem estabelecidas, com construção de células de cria ativa e presença de potes de alimento. Outras três colônias, em estado semelhante às demais, foram trazidas do meliponário da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (USP Ribeirão Preto), mesmo local de origem das demais colônias. Apesar da semelhança, observou-se certa variação

entre as colônias, de forma que as nove colônias foram classificadas em três grupos, de acordo com a força e sua origem mais recente:

- (1) colônias médias (com favos de cria com diâmetro entre 10 e 10,5 cm),
- (2) colônias fortes (com favos de cria com diâmetro entre 12 e 13 cm) e
- (3) colônias recém-chegadas de Ribeirão Preto (com favos de cria com diâmetro entre 9 e 13 cm).

Para a montagem do experimento, três grupos experimentais foram propostos, com diferenças em relação à quantidade de potes de alimento presentes nas colônias. Como as colônias de *S. aff. depilis* armazenam principalmente pólen (item 4.1.3), além desse parecer ser o recurso principalmente relacionado com a produção de indivíduos nas colônias, apenas os potes de pólen foram utilizados para definir os grupos experimentais. Para cada grupo, três colônias foram sorteadas, sendo que cada grupo experimental recebeu uma colônia de cada classe (1, 2 e 3), de forma que variações devido a características dessas classes fossem distribuídas entre os grupos. O experimento foi montado em outubro de 2012.

Para definir a quantidade de potes de pólen de cada grupo experimental, inicialmente, as colônias foram inspecionadas quanto ao número de potes de pólen presentes. Como os potes são construídos de forma sobreposta, dificultando a contagem, todos os potes presentes foram retirados, quantificados e pesados. O mel foi retirado, quantificado, e cada colônia recebeu entre 32,5 e 45 ml de mel. As colônias do grupo controle (Co) tiveram poucas alterações na quantidade de pólen presente, sendo que pouco pólen foi retirado ou adicionado, apenas com a finalidade de padronizar a quantidade de pólen presente no grupo (média de 366g ou o equivalente a 44 potes) (Fig.2). Assim, o grupo Co representou colônias não alteradas, cuja produção de sexuais representaria a produção normal referente à época do estudo. Com o restante do pólen encontrado nas demais colônias, foram montados grupos experimentais da forma mais contrastante possível. Assim, as colônias do grupo A receberam mais potes de pólen, resultando em uma quantidade média de 801g (ou o equivalente a 96 potes), enquanto foi retirado pólen das colônias do grupo B, resultando em uma quantidade média de 103g (ou o equivalente a 12 potes) (Fig. 2). Dessa forma, o grupo A apresentou duas vezes mais pólen que o grupo Co e quatro vezes mais que o grupo B. As colônias foram mantidas na área externa do laboratório e podiam forragear livremente. O experimento foi mantido durante quatro meses, sendo que nenhuma outra manipulação foi realizada nas colônias.

Figura 2. Número de potes de pólen presentes nas colônias experimentais antes e após a manipulação. O número de potes após a manipulação foi estimado a partir do peso de potes adicionados a cada colônia.

3.2.2. Coleta de dados

a) Produção de operárias, machos e rainhas

Para quantificar a produção de operárias, machos e rainhas, em intervalos de cerca de quinze dias, um favo de cria com abelhas prestes a emergir foi retirado de cada colônia, resultando em duas amostras para cada mês. Para verificar se as colônias experimentais produziam machos anteriormente ao experimento, um favo de cria de cada colônia foi coletado logo após o início do experimento. As coletas propriamente ditas foram iniciadas após 41 dias do início do experimento. Esse intervalo foi escolhido de acordo com o tempo de desenvolvimento de *Scaptotrigona* (Kleinert & Piva, 1992), de forma que foi coletado o primeiro favo de cria construído após o início dos tratamentos experimentais. Foram coletados seis favos de cria, com amostras referentes aos meses de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013. O método utilizado para quantificar operárias, machos e rainhas nos favos foi o mesmo utilizado no experimento 1 (ver item 3.1.5).

b) Potes de alimento

Mensalmente, durante uma das coletas de favos de cria, foram quantificados os potes de mel e de pólen em cada colônia. Para isso, os favos de cria foram retirados da caixa da colônia, de forma a se observar as áreas de construção de potes de alimento, e em seguida os potes foram contabilizados.

3.2.3. Análise de dados

Os grupos experimentais foram comparados em relação ao número total de células de cria produzidas, número de operárias, frequência relativa de machos, número de células reais, número médio de potes de pólen e número médio de potes de mel. Para isso, as variáveis foram analisadas quanto à normalidade de sua distribuição e à homogeneidade das variâncias, de forma a se escolher entre o teste paramétrico ou não paramétrico. A normalidade da distribuição foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. No caso do número de machos, a variável foi transformada para o $\log_{10}$, de forma a se adequar aos pressupostos do teste paramétrico. Para cada variável, sempre que os pressupostos foram atendidos, foi aplicado o teste de ANOVA por blocos randômicos, de forma que os grupos foram comparados considerando as classes as quais as colônias pertenciam inicialmente (1, 2 e 3). Quando o resultado foi significativo, aplicou-se o teste de Tukey para comparação entre pares. Quando os pressupostos do teste paramétrico não foram atendidos, foi aplicado o teste de Friedman, alternativa não paramétrica para o delineamento em blocos (Sokal & Rolf, 1995).

Para verificar a relação entre as variáveis, foi aplicada a correlação paramétrica de Pearson. Todas as variáveis foram correlacionadas, para determinar a relação entre crescimento da colônia, produção de sexuais e presença de recursos alimentares armazenados nas colônias (Zar, 1999). Em todas as análises, o nível de significância foi de 5%.

4. Resultados

4.1. Experimento 1

4.1.1. Crescimento das colônias

Logo após a montagem, as colônias experimentais apresentaram desenvolvimento normal, consumindo o alimento disponibilizado e iniciando a construção de células de cria. No entanto, no início do verão, o desenvolvimento das colônias foi comprometido devido às baixas temperaturas, não previstas para a época. Com o posterior aumento da temperatura, verificou-se o fortalecimento das colônias. Considerando os três meses de experimento de cada estação, as temperaturas médias do verão sempre foram mais altas que as do inverno e as temperaturas mínimas do inverno sempre foram mais baixas que as temperaturas mínimas do verão (Fig. 3).

Durante o experimento de verão, foram detectados quatro eventos de substituição de rainha. A colônia 7 (grupo A1) passou por duas substituições de rainha. A primeira ocorreu no início do experimento, quando a rainha fisogástrica da colônia não foi mais observada. Como não houve substituição natural, a rainha fisogástrica recém-estabelecida na colônia de origem dessa colônia experimental foi introduzida na colônia órfã. A segunda substituição ocorreu por volta de 13 de fevereiro e uma nova rainha foi estabelecida naturalmente. Outra substituição ocorreu na colônia 2 (grupo A2), por volta de 03 de janeiro. Não houve substituição natural, embora tenha sido verificada a presença de rainha virgem, de forma que foi necessário realizar o mesmo procedimento de introdução de uma rainha fisogástrica, descrito para a colônia 7. A colônia 3 (grupo A2) também apresentou troca natural de rainha (por volta de 19 de janeiro), após certo tempo órfã. Nenhuma substituição de rainha foi identificada durante o experimento de inverno, embora um possível evento de substituição possa ter ocorrido na colônia 23 (grupo A0 – controle, para detalhes, consultar seção seguinte).

Figura 3. Temperaturas máximas, médias e mínimas obtidas com os *data loggers* no interior do laboratório, para os meses de experimento (verão: janeiro a março; inverno estendido: julho a novembro).

O desenvolvimento das colônias ocorreu com grande variação dentro do mesmo grupo experimental (Fig. 4), embora as colônias inicialmente fossem padronizadas. Essa variação foi observada tanto no verão, como no inverno. Ao longo de todo experimento de verão, foi verificada alta mortalidade de operárias nas colônias confinadas, resultando no enfraquecimento das colônias e na ausência de construção de células de cria. Somente duas colônias confinadas, uma do grupo C2 (colônia 4) e outra do grupo C1 (colônia 11), apresentaram atividade de postura durante a maior parte do experimento. Já no inverno, observou-se dificuldade no estabelecimento das colônias do grupo A0 (controle), sendo que apenas duas colônias sobreviveram durante todo o experimento (colônias 9 e 23). Embora tenham sido montadas novas colônias ($n = 3$) para substituir as colônias mortas, nenhuma se estabeleceu com sucesso e todas morreram logo após o início do tratamento experimental.

Figura 4. Número médio de células de cria produzidas por dia para cada grupo experimental (média $\pm$ desvio padrão), nos experimentos de verão e inverno. Não foram consideradas as colônias que estavam órfãs durante a amostragem ou morreram.

No verão, o número médio de células de cria construídas por dia variou de zero a 311 células (Fig. 4). O fator confinamento produziu uma diferença significativa entre os grupos, nos três meses analisados (janeiro: $F = 37,96$; $p < 0,001$; fevereiro: $H = 8,46$; $p = 0,003$; março: $F = 12,86$; $p = 0,009$). Comparando-se os grupos aos pares (Teste de Tukey), foi observada uma diferença significativa entre os grupos A2 e C2 em janeiro ($p = 0,005$) e em março ($p = 0,041$), e entre os grupos A1 e C1 apenas em janeiro ($p = 0,044$). Em fevereiro, não houve diferenças significativas quando os grupos foram comparados par a par. A quantidade de alimento fornecida às colônias não produziu uma diferença significativa no número de células construídas por dia (janeiro: $F = 3,22$; $p = 0,12$; fevereiro: $H = 0,27$; $p = 0,6$; março: $F = 1,09$; $p = 0,33$). Comparando-se apenas os grupos com colônias abertas, verificou-se uma diferença significativa apenas no mês de fevereiro (janeiro: $F = 2,59$; $p = 0,17$; fevereiro: $F = 5,81$; $p = 0,049$; março: $F = 0,68$; $p = 0,54$). Nesse caso, houve uma diferença significativa entre os grupos A2 e A0 ($p = 0,045$). Não houve interação significativa entre os fatores de confinamento e alimentação (janeiro: $F = 2,64$; $p = 0,15$; fevereiro: $F = 1,08$; $p = 0,3$; $H = 1,08$; $p = 0,33$). No experimento de inverno, a construção de células de cria variou de zero a 453 células de cria por dia, em média (Fig. 4). Em nenhum dos quatro meses estudados, a quantidade de alimento fornecido promoveu diferenças significativas no número de células produzidas (agosto: $F = 0,23$; $p = 0,8$; setembro: $F = 0,012$; $p = 0,99$; outubro: $F = 0,11$; $p = 0,89$; novembro: $F = 0,6$; $p = 0,58$).

O número total de células produzidas, no verão, variou de 268 a 10.283 células de cria (sendo de 268 a 1255 células para colônias confinadas, e de 1983 a 10.283 células para colônias abertas), enquanto no inverno, variou de 302 a 12.966 células (Fig. 5a). No verão, foi encontrada uma diferença significativa no número de células devido ao confinamento ($H = 8,34$; $p = 0,004$), porém sem diferenças significativas quando os grupos foram comparados aos pares (A2 e C2: $U = 0$; $p = 0,049$; A1 e C1: $U = 0$; $p = 0,049$; considerando o nível de significância com a correção de Bonferroni: 0,025). Nessa mesma estação, a quantidade de alimento fornecido não produziu uma diferença significativa ($H = 0,64$; $p = 0,42$), nem quando foram comparados apenas os grupos com colônias abertas ($F = 0,32$; $p = 0,34$). Na comparação conjunta entre confinamento e alimentação, não houve interação significativa dos fatores ($H = 0$; $p = 1$). No inverno, também não houve diferença significativa no número de células devido à quantidade de alimento ($F = 0,27$; $p = 0,77$). Comparando a produção de células de cria nas duas

estações do ano, não foi encontrada diferença significativa devido à estação ($F = 0,79$; $p = 0,39$) e não houve interação entre a estação do ano e a quantidade de alimento fornecido ($F = 0,64$; $p = 0,42$).

Figura 5. (a) Número de células de cria e (b) número de favos de cria em cada grupo experimental, nas estações de verão e inverno. Os pontos indicam os valores médios de cada grupo e as barras mostram o desvio padrão.

Em relação ao número de favos de cria construídos, no verão, o número de favos variou entre 1 e 12 favos (sendo de 1 a 4 favos para colônias confinadas e de 4 a 12 para colônias abertas), enquanto no inverno variou de 1 a 15 favos (Fig. 5b). No verão, houve um efeito significativo no número de favos devido ao fator confinamento ($F =$

23,01; $p = 0,001$), sendo que as diferenças foram significativas entre os grupos A1 e C1 ($p = 0,02$), mas não entre os grupos A2 e C2 ($p = 0,06$). Não houve efeito devido à quantidade de alimento fornecido ($F = 0,01$; $p = 0,92$) ou devido à interação entre os fatores ($F = 0,26$; $p = 0,62$). Também não houve diferença significativa devido à alimentação na comparação entre os grupos com colônias abertas apenas ($F = 0,72$; $p = 0,74$). No inverno, também não foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos em relação à quantidade de alimento recebido ($H = 1,24$; $p = 0,53$). A comparação entre as estações indicou que houve uma diferença significativa entre o número de favos produzidos em cada estação ($H = 4,14$; $p = 0,042$), porém sem diferenças significativas quando os grupos foram comparados aos pares, de acordo com os níveis de alimentação recebida (A2: $U = 4$; $p = 0,3$; A1: $U = 5$; $p = 0,46$; A0: $U = 0$; $p = 0,08$; considerando o nível de significância com a correção de Bonferroni: 0,017). Não houve interação significativa entre as estações analisadas e a quantidade de alimento ($H = 0,45$; $p = 0,8$).

Nos três meses avaliados durante o experimento de inverno, a quantidade de operárias com ovários ativados sempre foi inferior à quantidade de operárias com ovários não ativados (agosto: 5,4%; setembro: 22,5% e outubro: 15,5%; Fig. 6). Não houve diferença significativa devido à quantidade de alimento fornecida para os meses de agosto ($H = 1,73$; $p = 0,42$) e outubro ($F = 1,56$; $p = 0,27$), porém, para o mês de setembro, a diferença entre os grupos foi significativa ($F = 5,87$; $p = 0,02$). Comparando os grupos par a par, verificou-se uma diferença significativa entre os grupos A2 e A1 ($p = 0,05$) e entre os grupos A1 e A0 ($p = 0,04$) (Teste de Tukey). Como as colônias do grupo A1 apresentaram maior quantidade de operárias com ovários ativados do que as operárias dos grupos A2 e A0, a diferença observada não parece relacionada ao tratamento experimental a que cada grupo foi submetido.

Figura 6. Grau de ativação dos ovários de operárias das colônias experimentais nos meses de agosto a outubro, durante o experimento de inverno. A classificação foi realizada de acordo com Bego (1982) e foram considerados não ativados os ovários das classes A, A' e B (em azul) e ativados os ovários das classes C, D e E (em verde).

A concentração de proteínas totais na hemolinfa das operárias apresentou grande variação entre os meses analisados e entre as colônias dentro de um mesmo mês (setembro: $23,6 \pm 4,9$ μg proteína/ μl hemolinfa; outubro: $25,6 \pm 2,1$ μg proteína/ μl hemolinfa; novembro: $16 \pm 2,2$ μg proteína/ μl hemolinfa) (Fig. 6). Comparando os grupos experimentais, não foi encontrada variação significativa para os meses de setembro ($F = 1,1$; $p = 0,42$) e outubro ($F = 0,69$; $p = 0,55$), porém a variação foi significativa para o mês de novembro ($F = 20,9$; $p = 0,008$). Na análise entre os grupos, verificou-se uma diferença significativa entre os grupos A2 e A1 ($p = 0,009$) e A1 e A0 ($p = 0,02$). Porém, essas diferenças parecem relacionadas às condições das colônias, e não aos tratamentos experimentais, pois seria esperado que os valores do grupo A0, que não recebeu reforço alimentar, fossem os menores, o que não foi verificado (ver Fig. 4).

Figura 7. Concentração de proteínas totais da hemolinfa de operárias, em cada colônia, coletadas no experimento de inverno nos meses de setembro, outubro e novembro. A ausência de barras em alguns meses indica que não houve coleta de hemolinfa.

4.1.2. Produção de operárias, machos e rainhas

A maior parte dos indivíduos produzidos nas colônias foi de operárias. No verão, o número de operárias variou de 268 a 10.225 indivíduos, sendo que para as colônias confinadas variou de 268 a 1.250 e para as colônias abertas variou de 1.236 a 10.225 (Fig. 8). No experimento de verão, não foi encontrada diferença significativa em relação à produção de operárias devido ao fator alimento, considerando apenas as colônias com

acesso ao meio externo ($F = 0,58$; $p = 0,59$), ou na comparação conjunta com o fator confinamento ($H = 0,93$; $p = 0,34$). O fator confinamento, por sua vez, provocou uma diferença significativa na produção de operárias nas colônias ($H = 7,43$; $p = 0,006$) e não houve interação entre os fatores de confinamento e alimentação ($H = 0$; $p = 1$). No inverno, também não foi observada diferença significativa na produção de operárias devido ao alimento ($F = 0,34$; $p = 0,72$). A comparação entre estações mostrou que as diferenças na produção de operárias entre verão e inverno não foram significativas ($F = 2,07$; $p = 0,17$), nem a interação entre a estação e a quantidade de alimento recebido ($F = 0,67$; $p = 0,52$).

Figura 8. Número de operárias produzidas em cada grupo experimental, nas estações de verão e inverno. Os pontos indicam as médias e as barras mostram o desvio padrão.

A produção de machos apresentou grande variação entre as colônias. No verão, entre as colônias confinadas, apenas a colônia 4 (grupo C2) apresentou produção de machos ($n = 5$; 0,4%). Já nas colônias com acesso ao meio externo, o número de machos produzidos variou de 3 a 747 machos (Fig. 9a). Apenas duas colônias produziram machos em grande quantidade, sendo que a colônia 7 (grupo A1) produziu 747 machos (38%) e a colônia 14 (grupo A0) produziu 630 machos (7%), correspondendo a 87% de todos os machos produzidos nas colônias abertas. A colônia 3 (grupo A2) teve apenas quatro favos analisados, pois os favos posteriores, construídos após uma substituição de rainha, tiveram muitas células destruídas e não foi possível analisá-los. Com o intuito de verificar se havia machos sendo produzidos nessa colônia, uma amostra de cerca de três favos foi retirada e analisada. Essa amostra continha 1592

células, sendo que 50 apresentaram machos (0,03%), porém esses valores não foram utilizados nas análises. Para avaliar a diferença entre a produção de machos devido à alimentação entre os grupos com colônias abertas, foi utilizado o $\log_{10}$ da variável e foi encontrado que a diferença entre os grupos não foi significativa ($F = 0,34$; $p = 0,73$). Na comparação conjunta entre o confinamento e a quantidade de alimento, encontrou-se uma diferença significativa devido ao confinamento ($H = 8,47$; $p = 0,004$), porém, sem diferenças significativas quando os grupos foram comparados aos pares (A2 e C2: $U = 0$; $p = 0,049$; A1 e C1: $U = 0$; $p = 0,049$; considerando o nível de significância com a correção de Bonferroni: 0,025). A quantidade de alimento também não gerou diferenças significativas entre os grupos ($H = 0,34$; $p = 0,56$), nem a interação entre os fatores analisados ($H = 0$; $p = 1$). Resultados semelhantes foram encontrados comparando-se as frequências de machos produzidos pelas colônias (Fig. 6b). A quantidade de alimento não gerou diferenças significativas na frequência de machos produzidos, tanto na comparação entre as colônias abertas ($H = 0,62$; $p = 0,73$), quanto na comparação conjunta dos fatores ($H = 0,06$; $p = 0,81$). Foi encontrada diferença significativa devido ao confinamento ($H = 5,46$; $p = 0,02$), porém, sem diferenças significativas quando os grupos foram comparados aos pares (A2 e C2: $U = 0$; $p = 0,049$; A1 e C1 não foram comparados devido ao número de dados insuficiente; considerando o nível de significância com a correção de Bonferroni: 0,025). Não houve interação significativa entre os fatores ($H = 0,06$; $p = 0,81$).

No inverno, também houve grande variação na produção de machos entre as colônias, porém, atingindo quantidades maiores de machos produzidos do que no verão. A produção total de machos variou de 3 a 4882 machos, sendo que a colônia 21 (grupo A1) produziu 1999 machos (16%) e a colônia 23 (grupo A0 – controle) produziu 4882 machos (80%), sendo responsáveis por 85% dos machos produzidos nessa estação (Fig. 9b). Vale ressaltar que durante os dois primeiros meses de experimento, por uma razão desconhecida, a colônia 23 (A0) não produziu operárias nos favos amostrados, sendo que todos os indivíduos produzidos foram machos, inclusive nas células “reais”, em que foram encontrados machos gigantes. Para avaliar a diferença entre a produção de machos devido à alimentação, foi utilizado o $\log_{10}$ da variável e foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos ($F = 4,38$; $p = 0,047$). Comparando-se os grupos aos pares, foi encontrada uma diferença significativa apenas entre os grupos A2 e A0 (controle) (teste de Tukey: $p = 0,039$). No entanto, a diferença entre os grupos deixa de ser significativa quando a colônia 23 (A0), que durante certo intervalo só produziu

machos, é retirada da análise, indicando que a quantidade de alimento não afetou realmente a produção de machos e que houve um viés na análise devido a uma só colônia. Para comparar os grupos em relação à frequência de machos produzidos, também foi utilizado a transformação para $\log_{10}$ da variável e não foi encontrada uma diferença significativa devido à alimentação ($H = 5,25$; $p = 0,07$).

(a)

(b)

Figura 9. (a) Número de machos produzidos ($\log_{10}$) e (b) frequência relativa de machos produzidos, nas estações de verão e inverno. Os pontos indicam as médias e as barras mostram o desvio padrão. No gráfico (a), apenas o desvio positivo foi indicado, devido à escala em logaritmo.

Entre as estações de verão e inverno não houve diferença significativa na produção de machos em números absolutos ($F = 0,59$; $p = 0,45$) ou na frequência relativa ($H = 0,91$; $p = 0,34$) (Fig. 5). Na análise com valores absolutos, verificou-se uma interação marginalmente significativa entre a estação analisada e a quantidade de alimento recebida ($F = 3,62$; $p = 0,052$), também devido ao efeito da colônia 23 (A0), como explicitado acima. Na análise entre estações com as frequências relativas dos machos não houve interação significativa entre os fatores ($H = 5,38$; $p = 0,07$).

Além dos machos normais, machos gigantes foram encontrados nas colônias, tanto no verão como no inverno. No experimento de verão, um macho gigante foi produzido na colônia 7 (grupo A1), concomitantemente à alta produção de machos (Fig. 10). Posteriormente ao experimento, foi encontrado outro macho gigante na colônia 14 (grupo A0 – controle), incluído nas análises morfométricas. No experimento de inverno, cinco machos gigantes foram encontrados, todos produzidos na colônia 23 (grupo A0 – controle), durante o intervalo de produção exclusiva de machos por essa colônia. Comparando os machos gigantes com machos normais (Tabela 3), verifica-se que há pouca sobreposição das medidas, porém não é possível afirmar que se tratam de dois grupos distintos.

Figura 10. Exemplares de machos produzidos na colônia 7 (grupo A1), experimento de verão: **a)** macho normal (à esquerda) e macho gigante (à direita); **b)** detalhe do macho gigante, vista lateral.

Tabela 3. Medidas em mm da distância intertegular, distância interorbital (tendo como referência a base da antena) e largura máxima da cabeça, para machos normais e gigantes, produzidos no verão e no inverno. (*) macho gigante produzido após o término do experimento.

Colônia	macho	estação	distância intertegular	distância interorbital	largura máxima da cabeça
7 (A1)	normal	verão	1,84	1,32	2,47
7 (A1)	normal	verão	1,95	1,37	2,47
7 (A1)	normal	verão	2,00	1,26	2,53
7 (A1)	normal	verão	2,00	1,42	2,53
7 (A1)	normal	verão	1,89	1,32	2,42
7 (A1)	normal	verão	1,95	1,26	2,47
7 (A1)	normal	verão	1,89	1,32	2,47
7 (A1)	normal	verão	1,95	1,37	2,42
7 (A1)	normal	verão	1,84	1,32	2,37
7 (A1)	normal	verão	1,95	1,32	2,42
23 (A0)	normal	inverno	1,84	1,26	2,26
23 (A0)	normal	inverno	2,00	1,32	2,42
23(A0)	normal	inverno	1,84	1,32	2,21
23 (A0)	normal	inverno	1,84	1,16	2,37
23 (A0)	normal	inverno	1,84	1,21	2,37
23 (A0)	normal	inverno	1,95	1,21	2,42
23 (A0)	normal	inverno	1,84	1,16	2,21
23 (A0)	normal	inverno	1,84	1,16	2,26
23(A0)	normal	inverno	2,00	1,21	2,42
23 (A0)	normal	inverno	1,84	1,26	2,42
7 (A1)	gigante	verão	2,32	1,58	2,89
14 (A0)*	gigante	verão	2,21	1,47	2,68
23 (A0)	gigante	inverno	2,11	1,47	2,63
23 (A0)	gigante	inverno	1,84	1,32	2,42
23 (A0)	gigante	inverno	2,11	1,47	2,58
23 (A0)	gigante	inverno	2,11	1,32	2,58

Em relação à produção de células reais, no verão, a produção variou de uma a seis células reais, sendo que as colônias confinadas não produziram nenhuma célula real durante o experimento (Fig. 11). Não houve diferença significativa devido à quantidade de alimento recebida quando foram comparadas as colônias abertas ($F = 0,21$; $p = 0,81$) ou na comparação conjunta com o confinamento ($H = 0,2$; $p = 0,65$). Ainda em relação à comparação conjunta, foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos

devido ao confinamento ($H = 7,2$; $p = 0,007$), porém, sem diferenças significativas quando os grupos foram comparados aos pares (A2 e C2: $U = 1,5$; $p = 0,19$; A1 e C1: $U = 0$; $p = 0,049$; considerando o nível de significância com a correção de Bonferroni: 0,025). Não houve interação significativa entre os fatores analisados ($H = 0,2$; $p = 0,65$). No inverno, a produção de células reais variou de uma a nove células reais, sendo que o valor máximo foi atingido apenas pela colônia 23 (grupo A0 - controle), que produziu apenas machos durante cerca de dois meses (Fig. 6b). Para avaliar a diferença entre o número de células reais devido à alimentação, foi utilizado o $\log_{10}$ da variável e não foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos ($F = 2,41$; $p = 0,14$).

Entre as estações de verão e inverno não houve diferença significativa na produção de células reais ($F = 0,012$; $p = 0,91$) (Fig. 6). Também não houve interação significativa entre a estação analisada e a quantidade de alimento recebida ($F = 2,05$; $p = 0,16$).

Figura 11. Número de células reais produzidas nas estações de verão e inverno. Os pontos indicam as médias e as barras mostram o desvio padrão.

No experimento de verão, também foram encontradas duas rainhas miniaturas, uma na colônia 2 (grupo A2) e outra na colônia 7 (grupo A1), no início de abril (Fig. 12, Tabela 4). No inverno, não foram observadas rainhas miniaturas nos favos amostrados. A comparação de medidas retiradas de rainhas miniaturas e rainhas normais mostra sobreposição em algumas medidas, o que indica que esses grupos podem não ser totalmente separados. Ressalta-se, ainda, que a rainha miniatura encontrada na colônia 7 foi produzida em um favo que continha duas células reais, que produziram duas rainhas,

e uma célula de tamanho intermediário (maior que uma célula normal). No entanto, devido à falta de observação direta, não é possível afirmar que a rainha miniatura tenha sido produzida nessa célula de tamanho médio.

Figura 12. Exemplares de rainhas virgens produzidas durante o experimento de verão: **a)** rainha miniatura; **b)** rainha normal.

Tabela 4. Medidas em mm da distância intertegular, distância interorbital (tendo como referência a base da antena) e largura máxima da cabeça, para rainhas normais e rainhas miniaturas, produzidos no verão.

colônia	rainha	estação	distância intertegular	distância interorbital	largura máxima da cabeça
2 (A2)	miniatura	verão	1,92	1,69	2,38
7 (A1)	miniatura	verão	1,83	1,77	2,46
7 (A1)	normal	verão	2,08	1,92	2,69
7 (A1)	normal	verão	1,92	1,92	2,54
8 (A1)	normal	verão	2,08	1,85	2,46
14 (A0)	normal	verão	2,23	1,92	2,69

4.1.3. Fatores relacionados à produção de operárias, machos e rainhas

Quantidade de alimento armazenado

No experimento de verão, não se realizou uma observação sistemática sobre a construção de potes de alimento, porém algumas características gerais do armazenamento de alimento foram observadas. Notou-se que apenas as colônias abertas

produziam potes de alimento, possivelmente apenas com o alimento coletado externamente, enquanto as colônias confinadas consumiam diretamente o alimento que recebiam, sem haver armazenamento. Entre as colônias abertas, observou-se grande variação na quantidade de potes construídos, sendo que o número de potes não parecia relacionado com o tratamento experimental recebido (quantidade de alimento), mas sim com a condição da colônia, encontrando-se mais potes em colônias mais fortes. Muitas colônias passaram a construir seus potes de alimento na caixa anexa, sendo que essa caixa foi completamente preenchida por potes nas colônias 2 (grupo A2) e 14 (grupo A0 – controle). Vale ressaltar que a colônia 14 apresentou produção de machos na estação analisada (7% dos indivíduos produzidos), o que poderia indicar uma relação com o alimento armazenado.

Figura 13. Número médio de potes de mel e de pólen nas colônias do experimento realizado no inverno.

No experimento de inverno, também se verificou grande variação na quantidade de potes de alimento construídos. As colônias mais fortes apresentavam maior número de potes, como no verão, e sempre foram encontrados mais potes de pólen do que de mel (Fig. 13). Nesse experimento, foi possível correlacionar a quantidade de alimento armazenado e a produtividade das colônias. Não foram encontradas correlações significativas em relação ao número médio de potes de mel nas colônias. Já para o número médio de potes de pólen, utilizando-se sempre a transformação para $\log_{10}$, foram encontradas correlações positivas com o número de machos ($r = 0,65$; $p = 0,021$),

com o número de células reais ($r = 0,76$; $p = 0,004$) e com o número total de células de cria produzidas ($r = 0,74$; $p = 0,006$) (Fig. 14). No entanto, a correlação não foi significativa para o número de operárias produzidas ($r = 0,53$; $p = 0,077$), nem para o número total de operárias com ovários ativados ($r = -0,36$; $p = 0,31$).

Poucas colônias foram analisadas quanto às proteínas presentes no pólen estocado, já que apenas algumas colônias armazenaram esse recurso. Assim como para a hemolinfa, foi verificada grande variação na porcentagem de proteínas no pólen (massa seca) entre as colônias e para a mesma colônia em diferentes meses (Tabela 2). Para verificar se a quantidade de proteínas no pólen em um mês influenciou a quantidade de proteínas na hemolinfa das operárias no mês seguinte, ou seja, para operárias alimentadas supostamente com esse pólen, as medidas de pólen de outubro foram correlacionadas com as medidas de hemolinfa de novembro. Porém, as medidas não foram significativamente correlacionadas ($r = -0,36$; $p = 0,64$). Também foi realizada a correlação entre a porcentagem de proteínas no pólen e o número de potes de pólen presentes na colônia, com a finalidade de verificar uma possível relação entre quantidade e qualidade do pólen, em cada mês. No entanto, as correlações não foram significativas para outubro ($r = -0,74$; $p = 0,26$) e apenas marginalmente significativas para novembro ($r = -0,93$; $p = 0,065$). O número médio de potes de mel não apresentou correlação significativa com o número médio de potes de pólen ($r = -0,26$; $p = 0,41$).

Tabela 2. Porcentagem de proteínas totais no pólen estocado nas colônias experimentais durante outubro e novembro (experimento de inverno).

tratamento	colônia	% de proteínas no pólen seco	
		outubro	novembro
A2	17	26,79	41,99
A1	21	49,23	-
A1	22	-	64,08
A0	9	27,88	21,00
A0	23	38,01	18,46

População da colônia e número de operárias com ovários ativados

Também foi verificada a relação entre a população da colônia e a produção de sexuais. No caso dos machos, nas duas estações, o número de machos ($\log_{10}$) foi positivamente correlacionado com o número médio de células de cria produzidas por dia

($r = 0,66$; $p = 0,001$) e, no inverno, foi correlacionado com o número de favos de cria produzidos ($r = 0,71$; $p = 0,01$). Não foi encontrada relação entre a produção de machos e o número de operárias com ovários ativados nas colônias ($r = -0,33$; $p = 0,35$). Já para as células reais, verificou-se uma correlação positiva, nas duas estações, com o número total de células de cria produzidas ($r = 0,47$; $p = 0,029$), com o número médio de células de cria produzidas por dia ($r = 0,48$; $p = 0,028$) e com o número de favos de cria produzidos ($r = 0,51$; $p = 0,019$). Essas correlações indicam que a produção de machos e rainhas apresenta uma relação direta com a população presente nas colônias.

Figura 14. Relações entre a produtividade das colônias e a quantidade de potes de alimento no experimento de inverno: o número de machos, células reais e células de cria foram correlacionados positivamente com o número de potes de pólen.

Produção de machos e células reais

A produção de machos ($\log_{10}$) e células reais foi correlacionada positivamente nas duas estações (verão: $r = 0,65$; $p = 0,017$; inverno: $r = 0,82$; $p = 0,001$) (Fig. 15), indicando que há uma relação direta entre a produção de sexuais nas colônias. A correlação permanece significativa, mesmo retirando-se da análise a colônia 23 (A0 – controle), que durante parte do experimento apresentou um comportamento anormal, com alta produção de machos e de células reais.

Figura 15. Relação entre o número de machos e de células reais produzidos nas colônias, durante os experimentos de verão e de inverno.

Analisando de forma conjunta as variáveis que apresentaram correlações significativas, no caso dos machos ($\log_{10}$), o modelo construído explicou de forma significativa a variação observada na produção de machos (variáveis: número de favos de cria, $\log_{10}$ número médio de células construídas por dia, número de células reais e $\log_{10}$ número médio de potes de pólen; $F = 12,72$; $p = 0,002$, $r^2 = 0,88$) (Tabela 5a). Também foi montado um modelo retirando a variável “número de favos”, visto que há uma grande correlação entre os favos e a construção de células de cria, já considerada no modelo ($F = 19,32$; $p = 0,005$; $r^2 = 0,88$) (Tabela 5b). A variável que mais explicou a produção de machos foi a quantidade de potes de pólen, porém, apresentando efeito significativo apenas no modelo em conjunto com o número de células reais ($F = 28,47$; $p = 0,001$; $r^2 = 0,86$) (Tabela 5c). Todos os modelos foram igualmente explicativos, sendo que a inclusão de mais variáveis não aumentou a capacidade de predição do modelo.

No caso das células reais, o modelo com todas as variáveis que apresentaram correlação significativa não explicou de forma significativa a variação encontrada (variáveis: $\log_{10}$ número de machos, número de favos de cria, número total de células de cria, $\log_{10}$ número médio de potes de pólen e $\log_{10}$ número médio de células construídas por dia; $F = 3,41$; $p = 0,08$, $r^2 = 0,74$) (Tabela 6a). Porém, quando o número médio de células de cria foi retirado da análise, o modelo passou a ser significativo ($F = 4,83$; $p = 0,034$, $r^2 = 0,73$). A fim de evitar vieses devido a informações redundantes, também foi construído um modelo considerando apenas o número de machos ($\log_{10}$), o número total

de células de cria e o número médio de potes de pólen ($\log_{10}$) ($F = 6,06$; $p = 0,019$, $r^2 = 0,69$) (Tabela 6b). No entanto, nesse modelo não houve nenhuma variável parcial com efeito significativo. A variável que mais explicou a produção de células reais foi o número de machos, porém, apresentando efeito significativo apenas no modelo em conjunto com o número total de células de cria ($F = 10,04$; $p = 0,005$; $r^2 = 0,69$) (Tabela 6c).

Tabela 5. Modelos de regressão múltipla para explicar a produção de machos nas colônias do experimento de inverno. **(a)** Modelo com todas as variáveis que apresentaram correlações significativas; **(b)** modelo retirando a variável “número de favos”, redundante com a informação dada pelo número médio de células de cria/dia; **(c)** modelo considerando apenas as variáveis que mais explicam a produção de machos: número de potes de pólen e número de células reais. Nesse modelo, os potes de pólen apresentam um efeito significativo.

(a)		(b)		(c)	
	<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
Potes de pólen ($\log_{10}$)	0,16	Potes de pólen ($\log_{10}$)	0,10	Potes de pólen ($\log_{10}$)	0,01
Nº células reais	0,17	Nº células reais	0,13	Nº células reais	0,12
Nº médio de células de cria/dia ($\log_{10}$)	0,53	Nº médio de células de cria/dia ($\log_{10}$)	0,35		
Nº favos	0,90				

Tabela 6. Modelos de regressão múltipla para explicar a produção de células reais nas colônias do experimento de inverno. **(a)** Modelo com todas as variáveis que apresentaram correlações significativas; **(b)** modelo retirando a variável “número de favos”, redundante com a informação dada pelo número de células de cria; **(c)** modelo considerando apenas as variáveis que mais explicam a produção de células reais: número de machos e número de células de cria. Nesse modelo, o número de machos apresenta um efeito significativo.

(a)		(b)		(c)	
	<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
Nº de machos ($\log_{10}$)	0,23	Nº de machos ($\log_{10}$)	0,12	Nº de machos ($\log_{10}$)	0,007
Nº total de células de cria	0,30	Nº total de células de cria	0,61	Nº total de células de cria	0,65
Nº de favos de cria	0,34	Potes de pólen ($\log_{10}$)	0,76		
Potes de pólen ($\log_{10}$)	0,61				

4.2. Experimento 2

4.2.1. Potes de alimento

Logo após o início do experimento, a diferença entre a quantidade de pólen armazenado nas colônias dos diferentes tratamentos diminuiu (Fig. 16a). No primeiro mês de coleta de dados (dezembro), foi verificado um grande aumento do número de potes de pólen nas colônias de todos os grupos experimentais. Esse aumento foi mais intenso para o grupo B, que apresentava menor quantidade de potes inicial e passou a apresentar quantidade semelhante ao grupo Co. Nos meses seguintes, o aumento do número de potes foi menos acentuado e para o grupo A, entre janeiro e fevereiro, houve uma diminuição dos estoques, em média. Dessa forma, as diferenças no número de potes devido ao tratamento experimental não foram mais observadas no momento da amostragem. Comparando-se o número médio de potes de pólen entre os grupos, durante todo o experimento, não houve diferença significativa entre eles (Teste de Friedman: $F = 2,0$; $p = 0,37$).

Semelhante à dinâmica dos potes de pólen, também foi observado um acentuado aumento no número de potes de mel, no primeiro mês de amostragem (Fig. 16b). Porém, esse aumento só continua nos meses seguintes para as colônias do grupo B. Comparando-se os grupos em relação ao número médio de potes de mel em todos os meses, não foi encontrada uma diferença significativa entre eles (ANOVA em blocos randômicos: $F = 9,44$; $p = 0,22$).

(a)

(b)

Figura 16. (a) Número de potes de pólen nas colônias dos três grupos experimentais, durante os meses de experimento (média + desvio padrão). Em outubro, observa-se o número de potes antes do início do experimento e, em seguida, o número de potes referente ao tratamento experimental (indicado pela seta). **(b)** Número de potes de mel nas colônias dos três grupos experimentais, durante os meses de experimento (média + desvio padrão). Em outubro, no início do tratamento experimental, os potes de mel foram retirados, e cada colônia recebeu uma quantidade padronizada de mel.

4.2.2. Crescimento das colônias

Ao longo do experimento, a maior parte das colônias cresceu e ficou mais forte, com apenas algumas colônias mais fracas. Comparando os grupos quanto ao número total de células de cria construídas, verificou-se que a diferença não foi significativa ($F = 0,58$; $p = 0,6$), ou seja, a quantidade inicial de potes de alimento não influenciou o crescimento das colônias durante o experimento (Fig. 17a). A maior parte das células de cria continha operárias, de forma que a diferença entre os grupos em relação à produção de operárias também não foi significativa ($F = 0,2$; $p = 0,82$) (Fig. 17b). No entanto, essas análises testam apenas o efeito da manipulação inicial dos potes de pólen sobre a produtividade das colônias durante os meses analisados, porém, sabe-se que para esses meses, o efeito dos tratamentos não era mais visível (ver item anterior). Dessa forma, para analisar o efeito direto dos tratamentos experimentais, apenas o favo de cria coletado no início de dezembro poderia ser analisado. Esse favo foi o primeiro construído após a manipulação dos potes de alimento, de forma que é possível afirmar que sua construção foi realizada enquanto ainda havia diferença entre os grupos em relação à quantidade de pólen. Assim, verificou-se que, para a amostra de dezembro (1), não houve diferença significativa quanto ao número de células de cria ($F = 11,64$; $p = 0,2$) e número de operárias entre os grupos ($F = 7,99$; $p = 0,24$).

4.2.3. Produção de machos e células reais

Antes do início dos tratamentos experimentais, apenas duas colônias apresentaram machos em seus favos de cria. A colônia A3 apresentou apenas um macho (0,3%) e a colônia Co3 apresentou 21 machos (3,5%), sendo que ambas haviam chegado recentemente de Ribeirão Preto. Observou-se grande variação na produção de machos entre as colônias e, comparando-se a frequência relativa nos três meses analisados, não houve diferença significativa devido ao tratamento experimental inicial ($F = 1,34$; $p = 0,36$) (Fig. 18). As colônias recém-chegadas de Ribeirão Preto (classe 3) apresentaram machos em grande quantidade, independente do grupo experimental, assim como as colônias da classe 2, enquanto as colônias da classe 1 produziram poucos machos. A colônia que mais produziu machos foi A3, com 21,5% de machos entre todas as células analisadas. Além dos machos normais, essa colônia produziu um macho gigante. Comparando-se os grupos apenas em relação à amostra de dezembro (1), referente ao tratamento experimental efetivo para as colônias, não foi observada

diferença significativa para a frequência relativa de machos (Teste de Friedman: $F = 0,0$; $p = 1,0$).

(a)

(b)

Figura 17. Número de células de cria (a) e número de operárias (b) presentes nos favos de cria, para os grupos experimentais A, Co e B (média + desvio padrão). Foram analisadas duas amostras a cada mês.

Figura 18. Frequência relativa de machos presentes nos favos de cria, para os grupos experimentais A, Co e B (média + desvio padrão). Foram analisadas duas amostras a cada mês.

A produção de células reais variou de uma a quatro células reais (Fig. 19). Porém, verificou-se que o método de coleta para essa variável não foi adequado, visto que muitas vezes o favo coletado não apresentava células reais, mas os favos adjacentes apresentavam, de forma que os valores podem não ser representativos da real produção de células reais pelas colônias. Apesar disso, realizando a comparação entre os grupos para testar o efeito inicial dos tratamentos experimentais, verificou-se que não houve uma diferença significativa (Teste de Friedman: $F = 1,4$; $p = 0,49$). Como não foi possível confirmar a presença de rainhas em todas as células reais, os dados sobre a produção de rainhas ficaram incompletos, de forma que apenas a análise sobre células reais foi realizada. Como na amostra de dezembro (1) apenas uma colônia apresentou célula real, não foi possível verificar o efeito direto dos tratamentos experimentais.

Figura 19. Número de células reais presentes nos favos de cria, para os grupos experimentais A, Co e B (média + desvio padrão). Foram analisadas duas amostras a cada mês.

4.2.4. Fatores relacionados à produtividade das colônias

O número médio de potes de pólen foi positivamente correlacionado com o número de células de cria ($r = 0,85$; $p = 0,003$), com o número de operárias ($r = 0,77$; $p = 0,015$) e com o número de machos ($r = 0,67$; $p = 0,049$) (Fig. 20). Dessa forma, verificou-se que, apesar de o tratamento experimental não ter efeito significativo sobre essas variáveis, o número de potes de pólen, ao longo do experimento, apresentou diferenças significativas. No entanto, o número de células reais não foi correlacionado significativamente com o número médio de potes de pólen ($r = 0,21$; $p = 0,96$). O número médio de potes de mel não apresentou correlação significativa com nenhuma das variáveis analisadas.

Além da correlação positiva com os potes de pólen, o número de machos foi positivamente correlacionado com o número de operárias ($r = 0,67$; $p = 0,048$), indicando uma relação entre a produção de machos e a população da colônia (Fig. 21). Por outro lado, a correlação do número de machos com o número de células reais não foi significativa ($r = 0,57$; $p = 0,11$).

Figura 20. Relação entre o número médio de potes de pólen e o número de células de cria, operárias e machos ($\log_{10}$) produzidos pelas colônias. As variáveis são correlacionadas positivamente (para detalhes, consulte o texto).

Figura 21. Relação entre o número de operárias e o número de machos produzidos nas colônias. Os valores são representados pela transformação para $\log_{10}$, por permitir uma melhor visualização da relação.

5. Discussão.

Em colônias de insetos sociais, o investimento em reprodutivos é interpretado como uma demanda conflitante em relação ao crescimento da colônia. Para as abelhas sem ferrão, a produção de sexuais pode ser influenciada por diversos fatores, sendo que nesse estudo a influência da quantidade de alimento (disponível e armazenado) e a sazonalidade (estações do ano contrastantes) foram investigados experimentalmente.

5.1. Experimento 1

5.1.1. Crescimento das colônias

No experimento realizado no verão, verificou-se que o confinamento foi um fator estressante para as colônias, e prejudicou seu desenvolvimento, sendo que apenas duas colônias confinadas mantiveram-se viáveis durante os três meses de experimento. Alguns fatores que podem estar relacionados ao baixo desempenho das colônias confinadas são: grande mortalidade de operárias mais velhas (forrageiras), prejudicando a construção de células de cria e dificultando a renovação dos indivíduos; quantidade de alimento insuficiente para o desenvolvimento das colônias; e ausência do aporte de material de construção e vedação da colônia (própolis), podendo favorecer a proliferação de ácaros e entrada de parasitas/predadores. Ressalta-se, porém, que a quantidade de alimento fornecida aos grupos experimentais não poderia ser excessiva, pois nesse caso, seria provável que o recurso não fosse totalmente consumido pelas colônias abertas e o excesso fosse rejeitado. No entanto, a técnica de confinamento não deve ser descartada, visto que, em outros experimentos, mostrou-se um procedimento viável. Estudos comportamentais realizados na Holanda (Universidade de Utrecht) utilizaram colônias confinadas durante vários meses, sendo que não foram relatadas mudanças no comportamento ou problemas na manutenção das colônias (Koedam, 1999; Chinh *et al.*, 2003). Partindo de mini-colônias de *S. aff. depilis*, Vollet Neto *et al.* (2010) mostraram que colônias confinadas apresentaram produção de células de cria 2,3 vezes maior do que colônias abertas com as mesmas condições. Além disso, em um experimento semelhante ao realizado nesse trabalho, colônias de *Tetragonisca angustula* foram mantidas confinadas e, apesar de algumas dificuldades durante o

procedimento, desenvolveram-se, e observou-se produção de sexuais em algumas colônias (Koffler & Kleinert, 2011).

Apesar do cuidado inicial com a padronização das colônias experimentais nas duas estações estudadas, foi verificada alta variação nas condições de desenvolvimento das colônias, o que contribuiu para o alto desvio apresentado por cada grupo de tratamento. Essa variação poderia ser explicada por um fator populacional, visto que a grande densidade de colônias em um mesmo local poderia elevar a competição por recursos, levando a colônias com diferentes desempenhos na população. Outros estudos ressaltam a variação das colônias, inclusive com análises estatísticas que consideram essa variação individual (Moo-Valle *et al.*, 2001; Morais *et al.*, 2006). Uma alternativa sugerida para essa alta variação seria a montagem de colônias menores, com um menor número de operárias, evitando o problema da alta mortalidade inicial (C. Menezes e A. Vollet Netto, inf. pessoal). Experimentos futuros poderiam testar essa proposta, realizando um acompanhamento do desenvolvimento das colônias e verificando se resulta em uma menor variação entre as colônias.

No verão, verificou-se diferença significativa em relação ao crescimento da colônia (número de células de cria construídas por dia e número total de células de cria), entre os grupos com colônias confinadas e abertas, pelos motivos já expostos acima. Porém, tanto no verão, como no inverno, a quantidade de alimento oferecida não gerou diferenças significativas no crescimento das colônias. A única exceção foi observada no segundo mês de coleta de dados (fevereiro), em que a quantidade de alimento gerou uma diferença significativa no número de células de cria construídas por dia. Comparando-se o número total de células de cria produzidas, também não houve diferença entre o crescimento das colônias entre as estações analisadas, embora, no inverno, as colônias tenham atingido maiores valores de produção de células. O número de favos de cria diferiu entre as estações, sendo maior no verão. No entanto, o número de favos pode não ser um bom indicativo do crescimento das colônias, pois seu tamanho deve ser considerado conjuntamente (Ferreira-Jr *et al.*, 2012). Conclui-se assim, que a alimentação artificial não parece afetar o desenvolvimento das colônias, mesmo no inverno, quando o reforço alimentar poderia ser mais importante para as colônias. Por outro lado, das oito colônias do grupo A0 (controle) construídas no inverno, apenas duas sobreviveram ao experimento. Dessa forma, sugere-se que o reforço alimentar foi importante na manutenção das colônias nessa estação, embora não tenha sido possível demonstrar isso na análise do crescimento das colônias.

Também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos em relação ao número de operárias com ovários ativados, porém, apenas as amostras do inverno foram analisadas. A condição de não ativação dos ovários sempre foi mais frequente, de forma que para todos os grupos, poucas operárias com ovários ativados foram encontradas. A partir dos resultados de Bego (1982), com colônias da mesma espécie, verifica-se que aparentemente há um menor número de operárias com ovos funcionais nos ovários durante os meses de inverno, o que poderia explicar os resultados encontrados. No entanto, é necessário diferenciar a presença de ovos tróficos e ovos funcionais, o que não foi feito nesse trabalho.

A análise da quantidade de proteínas na hemolinfa das operárias revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais apenas no mês de novembro. Porém, como esse efeito não apresentou relação com a quantidade de alimento recebido, conclui-se que a diferença observada ocorreu devido a outras características das colônias, que não o tratamento experimental. Além disso, verificou-se grande variação entre os valores obtidos para cada grupo experimental e entre os meses estudados, indicando mais uma fonte de variação em relação aos recursos alimentares nas colônias. Estudos realizados com *A. mellifera* indicaram que a quantificação da hemolinfa é um método eficaz para compreender efeitos de dietas nas abelhas, porém em estudos com dietas qualitativamente diferentes (Cremonez *et al.*, 1998; Cappelari, *et al.*, 2009; Morais *et al.*, *in press*). Essa foi a primeira experiência com a quantificação de proteínas da hemolinfa de abelhas sem ferrão e foi possível demonstrar a viabilidade dessa ferramenta, que pode ser empregada em outros tipos de estudos.

No verão, quatro eventos de substituição de rainha foram identificados no início do experimento, enquanto apenas um evento possivelmente ocorreu no inverno. Apesar de essas evidências sugerirem que as substituições de rainha poderiam ocorrer preferencialmente durante o verão, os dados não são suficientes para afirmar que existe um padrão temporal para essa dinâmica. Uma possibilidade que deve ser considerada é que a intensa manipulação das colônias durante a montagem e o andamento do experimento poderia ter provocado as substituições observadas. Nos casos observados, a substituição de rainhas não esteve relacionada a uma maior produção de machos ou células reais, com exceção de um caso (colônia 7, grupo A1), como será discutido adiante.

5.1.2. Produção de operárias, machos e rainhas

A maior parte dos indivíduos produzidos nas colônias foi de operárias, assim como observado em outros trabalhos (Bego, 1982; Moo-Valle *et al.*, 2001; Chinh & Sommeijer, 2005; Alves *et al.*, 2009). Assim como para as células de cria produzidas nas colônias, houve efeito significativo devido ao confinamento no experimento de verão, porém não houve efeito devido à quantidade de alimento recebida pelas colônias, nas duas estações estudadas. Também não se verificou diferença entre a produção de operárias no verão e no inverno. O investimento majoritariamente em operárias está de acordo com o papel desempenhado por essa casta, essencial para a manutenção do ninho.

No verão, a produção de machos foi influenciada pelo confinamento. Apenas uma colônia confinada produziu machos, o que, embora em baixa quantidade, revelou que a produção de machos pode ocorrer na condição de confinamento. Ainda no verão, verificou-se que não houve diferença na produção de machos devido à quantidade de alimento recebida pelas colônias. Já no inverno, houve uma diferença significativa pela quantidade de alimento, porém, devido a uma colônia do grupo A0 (controle), que apresentou o comportamento anormal de produzir apenas machos durante dois meses, aproximadamente. Quando essa colônia é retirada da análise, a diferença deixa de ser significativa. Resultados semelhantes foram obtidos a partir da análise das frequências relativas de machos produzidos, indicando que, mesmo padronizando os valores de acordo com a produção total de indivíduos na colônia, não há influência do alimento fornecido sobre a produção de machos.

Entre as estações estudadas, não houve diferença na produção de machos. Dessa forma, os machos foram produzidos igualmente entre as estações, confirmando estudos prévios em que os machos foram encontrados o ano todo (Cortopassi-Laurino, 1979; Bego, 1982; van Benthem *et al.*, 1995; Moo-Valle *et al.*, 2001; Chinh & Sommeijer, 2005). Como a substituição de rainhas em *Scaptotrigona* aff. *depilis* parece ser frequente, a produção de machos o ano todo pode ser vantajosa, pois haveria oportunidades de acasalamento em várias ocasiões (Bego, 1977; van Veen *et al.*, 2004).

Em cada estação, as colônias apresentaram grande variação em relação à produção de machos, e a maior parte das colônias produziu baixas frequências de machos, sendo que foi verificada uma dominância da produção de machos por poucas colônias. A produção restrita a um intervalo, ao nível da colônia, porém com a presença

de machos o ano todo no nível populacional, caracteriza os *Male Producing Periods* (MPPs), descritos por Velthuis (2005) e parece ser um padrão seguido por *S. aff. depilis*. Bego (1977), acompanhando por dois anos colônias de *S. aff. depilis*, também mostrou que há grande variação na produção de machos entre colônias, em um mesmo intervalo de análise. No entanto, os valores de produção de machos apresentados pela autora são em geral mais altos que os encontrados nesse trabalho. A partir disso, sugere-se que as frequências observadas poderiam ser derivadas do fato de as colônias experimentais terem sido montadas pouco tempo antes do início do experimento. Ou seja, as colônias poderiam estar em uma fase de aclimação e estabelecimento, o que poderia explicar o baixo investimento em machos, como sugerido por Oster & Wilson (1978). Nesse caso, seria mais vantajoso para a colônia investir seus recursos em crescimento, isto é, produção de operárias, do que investir na produção de machos, que não contribuem para o crescimento da colônia (Cortopassi-Laurino, 1979; Velthuis *et al.*, 2005).

No verão, apenas duas colônias produziram grandes quantidades de machos. No caso da colônia 14 (grupo A0 – controle), a colônia apresentou-se forte durante todo o experimento, com grande população e grande quantidade de potes de alimento, sugerindo que o alimento e a população possam estar relacionados com a produção de machos. Porém, a colônia 2 (grupo A2) não produziu muitos machos, apesar de apresentar uma condição bastante semelhante à da colônia 14. Outro caso de alta produção de machos ocorreu na colônia 7 (grupo A1), que também exibiu alta produção de células reais. Esse padrão parece estar relacionado à substituição da rainha da colônia, que ocorreu próxima a esses eventos. Anteriormente à substituição, foi verificada alta produção de sexuais, sugerindo um alto investimento em reprodução anterior à morte da rainha. Após o estabelecimento da nova rainha, a produção de machos diminuiu, porém a construção de células reais continuou, o que pode estar relacionado a um “investimento de segurança”, caso a rainha atual não apresente bom vigor (por exemplo, alta produção de ovos). O mesmo foi observado em colônias de *Tetragonisca angustula* com novas rainhas (S. Koffler, inf. pessoal). No entanto, não foi possível saber se os machos produzidos seriam filhos da rainha e/ou das operárias. Por outro lado, a alta produção de machos, seguida de substituição de rainha, poderia também caracterizar a produção de machos diplóides na colônia. A produção de machos diplóides ocorre devido ao sistema de determinação sexual complementar (CSD: “*complementary sex determination*”), em que um indivíduo diplóide, homozigoto no

locus sexual, desenvolve-se em um macho, ao invés de uma operária (Zayed & Packer, 2005). Nesses casos, grandes quantidades de machos são produzidas, acarretando em um grande custo para a colônia.

Além de machos normais, também foram encontrados machos gigantes, produzidos em células reais. No verão, um macho gigante foi encontrado durante o intervalo de alta produção de machos, na colônia 7 (A1). De acordo com a hipótese discutida acima, essa colônia poderia estar em uma fase de produção de machos diplóides, sendo que o macho gigante teria sido produzido a partir de um ovo que deveria gerar uma rainha em uma célula real. No inverno, quatro machos gigantes foram encontrados na colônia 23 (A0 – controle), durante o intervalo em que apenas machos foram produzidos. A produção de machos gigantes já foi descrita para várias espécies e, em alguns casos, está associada à produção de machos por operárias em colônias órfãs (Imperatriz-Fonseca & Oliveira, 1976; Bego, 1977; Koffler & Kleinert, 2012). Ainda não se sabe se esses machos são viáveis reprodutivamente e consistiriam em uma diferente estratégia reprodutiva do grupo. Santos (C. Santos, inf. pessoal) verificou, para *Tetragonisca fiebrigi*, a presença de um macho gigante no interior de uma colônia com rainha; e um macho gigante de *Plebeia droryana* foi coletado em uma aglomeração de machos da espécie (Cortopassi-Laurino, 1979). Dessa forma, mais estudos são necessários para compreender essa questão e verificar se a produção desses machos deve ser interpretada como alocação de recursos da colônia em reprodução.

Em relação à produção de células reais, assim como no caso do número de operárias e de machos, houve diferença entre os grupos devido ao confinamento, no verão. Não houve produção de células reais pelas colônias confinadas, embora em um teste prévio ao experimento tenha se observado a construção de uma célula real em uma colônia confinada, indicando que a produção de células reais pode ocorrer durante o confinamento. Nas duas estações, a quantidade de alimento não produziu um efeito significativo sob a produção de células reais e também não houve diferença entre as estações. Como a presença de uma rainha é essencial à sobrevivência da colônia, o investimento constante e independente da presença de recursos, ou da época do ano, em células reais pode ser justificado, significando uma garantia que a rainha atual possa ser substituída, caso haja necessidade (morte ou diminuição da qualidade da rainha). O alto investimento em células reais parece bastante relacionado à característica observada para a espécie de alta frequência de substituição de rainhas, ao menos durante o verão.

Além de rainhas normais, foram encontradas rainhas miniaturas nas colônias experimentais, somente no verão. A primeira observação desse tipo de rainha, nessa espécie, foi realizada recentemente por Alves, e já existem registros de colônias com rainhas miniaturas fisogástricas (D. Alves, inf. pessoal). A hipótese de que rainhas miniaturas seriam originadas de ovos destinados à produção de operárias que conseguem escapar desse destino, explicaria a produção dessas rainhas (para revisão, ver Ribeiro *et al.*, 2006). Com isso, a produção de rainhas miniaturas pode ser interpretada como um investimento em reprodução em abelhas sem ferrão. Nesse estudo, apenas duas rainhas miniaturas foram produzidas, aparentemente independentemente da quantidade de recursos alimentares. Embora não tenha sido encontrada diferença na produção de células reais entre os grupos experimentais, as duas colônias que produziram as rainhas miniaturas também apresentaram as maiores produções de células reais.

5.1.3. Fatores relacionados à produção de operárias, machos e rainhas

Colônias de *Scaptotrigona* aff. *depilis* parecem armazenar principalmente pólen nos ninhos, havendo uma grande variação entre a quantidade de potes entre as colônias, o que parece relacionado com o tamanho populacional da colônia. A porcentagem de proteínas totais no pólen estocado também apresentou grande variação e apesar de não ser possível aplicar um teste estatístico, não parece haver relação com o tratamento experimental ao qual a colônia foi submetida. Não foi verificada relação entre o número de potes de pólen na colônia e a quantidade de proteínas presentes no pólen, sugerindo não haver uma relação entre quantidade e qualidade do pólen armazenado. No entanto, poucas colônias desse estudo estocaram pólen, sendo que não é possível concluir se esse é um padrão definitivo. Estudos mais detalhados sobre o tema podem auxiliar na compreensão dessa questão. A análise qualitativa do pólen coletado pelas abelhas é uma importante medida, pois mesmo em épocas de recursos polínicos abundantes, é possível que a qualidade do pólen seja baixa, o que pode afetar a produtividade das colônias (M. Moraes, inf. pessoal). A produção de machos, células reais e células de cria em geral (machos e operárias) foi correlacionada com a quantidade de potes de pólen armazenados nas colônias. No entanto, não foram encontradas correlações significativas entre a produtividade das colônias e os potes de mel. Dessa forma, observa-se que, embora a quantidade de alimento disponibilizada para cada tratamento experimental não

tenha produzido diferenças no crescimento e na produção de sexuais pelas colônias, foi encontrada uma relação entre essas variáveis e a quantidade de alimento armazenado, ao longo do experimento. Apesar de não ser possível estabelecer uma relação de causalidade, há um padrão claro entre as variáveis. Essa relação direta entre a produção de machos e células reais com a quantidade de potes de alimento corrobora outros estudos e sugerem que o alimento armazenado, e não o alimento disponibilizado, apresenta uma relação com a produção de machos (Bego, 1990; van Veen *et al.*, 1992; Grosso *et al.*, 2000; Moo-Valle *et al.*, 2001; van Veen *et al.*, 2004; Chinh & Sommeijer, 2005). Também foram encontradas correlações positivas entre a produção de machos e células reais com variáveis relacionadas ao tamanho da população da colônia. Essa relação já foi descrita em outros trabalhos (Bego, 1990; Koedam, 1999; Alves, 2004), indicando que a produção de sexuais nas colônias está diretamente relacionada ao tamanho da população. Isso sugere que colônias maiores e provavelmente já estabelecidas poderiam arcar com os custos de uma quantidade maior de machos, sem prejudicar o desenvolvimento da colônia, como previam Oster & Wilson (1978). Uma maior quantidade de operárias também resultaria em um maior número de forrageiras, o que por sua vez, levaria a um aumento na quantidade de recursos alimentares coletados e trazidos ao ninho. Essa interação entre tamanho populacional e quantidade de alimento deve ser considerada na questão da produção de sexuais, o que será discutido adiante. Além disso, a correlação entre tamanho da população da colônia e número de células reais poderia indicar a possibilidade de enxameagem pela colônia, processo que requer um grande número de operárias (Michener, 1974).

Outra relação observada mostrou que a produção de machos é correlacionada positivamente com a produção de células reais, mostrando que são diretamente relacionadas e podem ocorrer de forma sincrônica nas colônias. Resultado semelhante também foi observado por outros estudos (Bego, 1990; van Veen *et al.*, 2004; Chinh & Sommeijer, 2005; Morais *et al.*, 2006). Esse padrão é interessante, pois a fim de evitar cruzamentos endogâmicos, se esperaria que as colônias investissem em machos e rainhas em momentos distintos, porém isso não parece acontecer para várias espécies de abelhas sem ferrão. Dessa forma, outros mecanismos devem atuar para diminuir a probabilidade de machos e rainhas relacionados se acasalarem (tempo de maturação diferente entre machos e rainhas, mecanismos de reconhecimento de indivíduos relacionados).

O número de operárias com ovários ativados não foi correlacionado significativamente com a presença de potes de pólen, de forma que a ativação dos ovários não parece depender da quantidade de recursos estocados no ninho. Também não se verificou uma correlação significativa entre a quantidade de operárias com ovários ativados e a produção de machos nas colônias. Bego (1982, 1990) verificou, para *S. aff. depilis*, que, durante as fases de produção de machos, havia um maior número de operárias com ovos férteis nos ovários, bem como um maior número de células com mais de um ovo em seu interior, o que é atribuído à oviposição por operárias (Beig, 1972). Assim, era esperado que colônias que apresentassem produção de machos tivessem maior quantidade de operárias com ovários ativados, o que não aconteceu. Apenas as amostras de operárias coletadas no inverno puderam ser analisadas, de forma que não é possível saber se haveria alguma diferença no verão. Como pode haver um padrão sazonal da produção de ovos férteis, futuros trabalhos podem investigar a reprodução de operárias em diferentes épocas do ano.

Na análise conjunta das relações encontradas, verificou-se que a variável que mais explicou a produção de machos nas colônias foi a quantidade de potes de pólen, seguida pelo número de células reais. A partir do modelo construído, conclui-se que o alimento armazenado é o principal determinante da produção de machos. Porém, como mencionado anteriormente, o tamanho populacional também é relacionado com o aumento dos estoques de alimento no ninho (maior quantidade de forrageiras), sendo que há uma forte interação entre esses fatores. Dessa forma, apesar de o número de operárias não ser o principal fator que explica a produção de machos no modelo, essa influência não pode ser desconsiderada. Uma possível explicação para o resultado encontrado é que o número de potes de pólen apresenta uma variação em escala de menor amplitude do que o número de operárias, de forma que, numericamente, a relação entre os potes e a quantidade de machos é mais forte. Já para a produção de células reais, o fator que mais explica a variação observada é o número de machos produzidos, seguido do número de células de cria. Nesse caso, não parece haver uma relação tão forte com a quantidade de potes de pólen, como encontrado para a produção de machos. Esse resultado está de acordo com Moo-Valle *et al.* (2001), que observaram que a produção de rainhas, embora variasse de acordo com a quantidade de potes de alimento, variava menos que a produção de machos. No entanto, a produção de células reais está relacionada principalmente com a produção de machos que, por sua vez, é dependente do número de potes de pólen.

Considerando a grande variação encontrada dentro de cada grupo experimental, nas duas estações analisadas, é possível discutir a efetividade dos tratamentos experimentais (quantidade de alimento) aos quais as colônias foram submetidas. Tanto em relação ao desenvolvimento da colônia, como em relação à produção de sexuais, os resultados mostram uma grande variação e as diferenças entre os grupos não foram significativas. Além disso, analisando o desenvolvimento das colônias no experimento de inverno, verificou-se que a produção de sexuais estava relacionada com a quantidade de recursos alimentares estocados e a população da colônia, ou seja, fatores ligados ao desenvolvimento das colônias durante o experimento e não relacionados aos tratamentos experimentais. Dessa forma, apesar de não ter encontrado diferenças significativas entre os grupos, os resultados não permitem refutar a hipótese inicial em relação à influência direta da quantidade de recursos alimentares sobre a produção de sexuais e sobre a ativação dos ovários das operárias. Do mesmo modo, com a grande variação demonstrada pelas colônias, não é possível refutar a hipótese sobre o efeito da sazonalidade, comparando a diferença entre as duas estações do ano estudadas.

5.2. Experimento 2

Apesar da intensa modificação na quantidade de pólen estocado nas colônias experimentais, pouco tempo após o início do experimento, as colônias apresentaram um rápido aumento no número de potes estocados. Com isso, as diferenças entre os tratamentos experimentais não foram mais observadas no primeiro mês de coleta de dados. Esse aumento indica uma alta disponibilidade de recursos no ambiente, o que está de acordo com a época em que o experimento foi realizado (fim da primavera e início do verão) (Knoll, 1990). É possível que em épocas do ano com menor quantidade de alimento disponível, como no inverno, o resultado seja diferente, e as colônias tenham maior dificuldade em recuperar seus estoques de pólen. No experimento 1, a grande mortalidade das colônias que não receberam reforço alimentar (grupo A0 – controle), no inverno, fornece evidências favoráveis a essa hipótese. Além disso, o aumento ocorreu diferencialmente entre as colônias, sendo mais acentuado para as colônias do grupo B, que inicialmente tinham a menor quantidade de pólen estocado. Essa alta capacidade de recuperação do estoque de alimento está relacionada com a plasticidade das colônias, de acordo com as necessidades do ninho. Foi demonstrado que colônias de *Melipona favosa*, submetidas a uma diminuição do pólen armazenado,

passaram a alocar mais operárias para a coleta do recurso disponibilizado no ninho (Kolmes & Sommeijer, 1992). Também é conhecido que operárias conseguem reconhecer o tipo de recurso (néctar ou pólen) que está em falta na colônia, passando a coletá-lo ao iniciarem suas atividades como forrageiras (Hosfede & Sommeijer, 2006). Assim, sugere-se que as colônias de *S. aff. depilis* tenham passado pelo mesmo processo, priorizando a coleta de pólen após a manipulação experimental, principalmente no grupo B. Uma opção para melhorar esse delineamento seria continuar com a manipulação dos potes de alimento ao longo do experimento, mantendo a diferença inicial entre os grupos experimentais. Em um experimento semelhante ao realizado nesse trabalho, Moo-Valle *et al.* (2001) manipularam a quantidade de potes de alimento em *Melipona beecheii*, porém, para essa espécie, a diferença entre os grupos foi mantida pelas colônias ao longo dos doze meses de coleta de dados. Esses resultados contrastantes reiteram as diferenças entre as abelhas do gênero *Melipona* e os demais gêneros de abelhas sem ferrão, sendo que os últimos parecem apresentar um comportamento mais resiliente às alterações nos ninhos, mesmo uma drástica diminuição dos estoques de alimento, como o realizado nesse experimento.

Assim, o efeito do tratamento experimental pôde ser testado somente na primeira amostra de favos de cria coletada, visto que esses favos foram construídos exatamente após a manipulação experimental e antes da recuperação dos estoques de alimento pelas colônias. Não foi verificada diferença significativa no número de células de cria, número de operárias e frequência relativa de machos. O número de células reais não pôde ser testado, visto que, nessa amostra, apenas uma célula real foi encontrada. Analisando todas as amostras de favos de cria, de forma a analisar se o efeito inicial da manipulação teria provocado alguma diferença na produtividade das colônias ao longo do experimento, não foi verificada diferença significativa para a produção de células de cria, operárias, machos e células reais. Assim, não houve efeito da manipulação experimental em curto ou em longo prazo.

No entanto, foi encontrada uma correlação significativa entre a produção de machos e a quantidade de potes de pólen nas colônias, corroborando os resultados do experimento 1 e estudos prévios (Bego, 1990; van Veen *et al.*, 1992; Grosso *et al.*, 2000; Moo-Valle *et al.*, 2001; van Veen *et al.*, 2004; Chinh & Sommeijer, 2005). Assim, apesar de não haver efeito da quantidade de potes de pólen referente ao tratamento experimental, há uma correlação entre o número de potes de pólen construídos durante o experimento e a produção de machos. Já para a produção de células reais, não foi

encontrada correlação significativa com a quantidade de potes de pólen, porém, isso provavelmente ocorreu por haver uma amostra insuficiente de células reais por colônia. Considerando essas evidências em conjunto, não é possível refutar a hipótese de que a produção de sexuais é diretamente influenciada pela quantidade de recursos alimentares. Esse resultado contrasta com o resultado encontrado por Moo-Valle *et al.* (2001), em que o tratamento experimental de manipulação da quantidade de potes resultou em uma diferença na produção de sexuais, não havendo, porém, uma relação entre a quantidade de potes ao longo do experimento e a produção de machos e rainhas. Nesse trabalho, ocorreu o oposto, visto que o tratamento experimental não promoveu diferenças entre as colônias, porém, a quantidade de potes de alimento foi correlacionada com a produção de sexuais.

O número de potes de mel não apresentou correlação significativa com a produção de machos, ou outras variáveis. A partir disso, conclui-se que a quantidade de mel não influenciou o desenvolvimento e a produção de sexuais nas colônias. Alguns estudos analisam os potes de mel e pólen de forma conjunta, afirmando que a produção de sexuais é influenciada pela quantidade de potes de alimento como um todo (Bego, 1990; van Veen *et al.*, 1992, Grosso *et al.*, 2000; Moo-Valle *et al.*, 2001). Porém, esse estudo mostra a importância de analisar os recursos da colônia de forma separada, como realizado por van Veen *et al.* (2004).

O número de células de cria e o número de operárias também foram correlacionados com o número de potes de pólen, indicando que o crescimento da colônia possui uma relação com a presença de recursos (pólen) presentes na colônia. Também foi encontrada uma relação entre o tamanho da população (número de operárias) e a produção de machos, como observado por Bego (1990), Koedam (1999) e Alves (2004). No experimento 1, essa relação não havia sido encontrada, sendo que a relação da produção de machos com o tamanho da população foi testado por meio do número de favos de cria. Assim como discutido para o experimento anterior, há o tamanho da população da colônia e a quantidade de potes são fatores bastante relacionados, de forma que é esperado que colônias com maior população possam coletar uma maior quantidade de recursos, e que isso resulte em uma maior produção de machos. Dessa forma, todas essas variáveis seriam positivamente correlacionadas, como encontrado nesse trabalho. van Veen *et al.* (2004), em um estudo com *Melipona beecheii*, encontrou uma relação negativa entre a produção de cria e a produção de machos e rainhas. Nesse caso, havia influência da quantidade de alimento armazenado,

porém, a produção de machos resultou em um menor investimento em operárias, sugerindo uma demanda conflitante para a colônia. A mesma relação foi observada por Santos-Filho *et al.* (2006), em cinco espécies de abelhas sem ferrão. Aqui, a utilização dos recursos pareceu ocorrer de forma diferente, sendo que o maior aporte de pólen resultou em um maior investimento em cria, como também em machos. Dessa forma, verifica-se grande variação entre as espécies estudadas. Essas evidências divergentes precisam ser melhor estudadas, de forma a contribuir para o aumento da compreensão da alocação de recursos na colônia.

6. Conclusões

- O confinamento de colônias de *Scaptotrigona* aff. *depilis* (experimento 1) apresentou algumas dificuldades e poucas colônias confinadas sobreviveram, o que pode estar relacionado às condições de montagem e alimentação durante o experimento. No entanto, foram produzidos machos em uma colônia confinada, indicando que a técnica pode ser viável para o estudo da produção de sexuais, após aprimoramentos.
- Nos dois experimentos realizados, mesmo quando as colônias foram inicialmente padronizadas, observou-se grande variação entre as colônias, sugerindo-se que seja devido a um efeito de competição e que a população seria formada por colônias mais fracas e colônias mais fortes.
- No experimento 2, após a manipulação da quantidade de potes de pólen nas colônias, houve uma rápida recuperação dos estoques, principalmente nas colônias com menor quantidade de pólen inicial. Isso demonstra a plasticidade das colônias, de acordo com as necessidades do ninho. Assim, o tratamento experimental foi válido apenas para o início do experimento.
- Não foi verificado efeito da quantidade de alimento, tanto disponibilizado (experimento 1), quanto armazenado (experimento 2), na produção de machos e rainhas. Apesar disso, nos dois experimentos, a quantidade de potes de pólen foi correlacionada positivamente com a produção de machos e, no experimento 1, também verificou-se uma correlação positiva com a produção de células reais. Com isso, conclui-se que há uma relação entre a produção de sexuais e a quantidade de alimento armazenado, embora não seja possível estabelecer

relações de causa e efeito. Considerando essas evidências em conjunto, a hipótese de que a quantidade de recursos alimentares influencia diretamente a produção de sexuais não pôde ser refutada nesse trabalho.

- A quantidade de pólen armazenado também foi correlacionada com a produção de cria das colônias, indicando que, com mais recursos disponíveis, a colônia cresce mais. Colônias de *Scaptotrigona* aff. *depilis* armazenam preferencialmente pólen, de forma que esse parece ser o principal recurso influenciando o crescimento da colônia.
- O tamanho da população da colônia, por sua vez, foi correlacionado positivamente com a produção de machos. Assim, observa-se que a produção de machos não leva à diminuição da produção de operárias e que os recursos são alocados nos dois tipos de indivíduos. Essa relação dá suporte à previsão de demanda conflitante entre a produção de machos e operárias, sendo que há um maior investimento em machos apenas quando a colônia também investe mais em operárias. No experimento 1, também houve uma correlação positiva entre o tamanho da população da colônia e a produção de células reais. Isso poderia estar associado à possibilidade de enxameagem da colônia.
- Ainda em relação ao experimento 1, nas duas estações, encontrou-se uma correlação positiva entre o número de machos e o número de células reais produzidas, indicando que podem ocorrer de forma sincrônica dentro de cada estação, ou seja, as colônias não parecem alternar a produção de machos e de rainhas.
- No experimento de inverno (experimento 1), verificou-se que, entre as variáveis correlacionadas com a produção de sexuais, a produção de machos foi mais explicada pelo número de potes de pólen e número de células reais, enquanto a produção de células reais foi mais explicada pelo número de machos e número de células de cria. No entanto, nos dois casos, deve-se considerar que as variáveis quantidade de alimento estocado e tamanho da população do ninho são bastante relacionadas, dificultando sua análise em separado.
- Entre as estações do ano estudadas, não se verificou diferença no crescimento das colônias e na produção de sexuais, com exceção da variável número de favos de cria. Porém, essa variável não indica diretamente o crescimento da colônia, visto que, para isso, deve ser considerado também o tamanho de cada

favo. Apesar da ausência de diferenças entre as estações, devido à grande variação entre as colônias, a hipótese de que há uma regulação temporal da produção de machos também não pôde ser refutada.

- Não houve efeito dos tratamentos experimentais sobre a ativação dos ovários das operárias, porém, devido à grande variação dentro dos grupos, as evidências não são suficientes para refutar a hipótese que a quantidade de alimento afete diretamente a ativação dos ovários das operárias. Também não houve relação entre o número de operárias com ovários ativados e a produção de machos nas colônias, sendo que é sugerido que os machos encontrados não eram filhos das operárias.
- Em relação à produção de machos, também houve grande variação, verificando-se a dominância da produção por poucas colônias. Isso sugere que as colônias de uma mesma população não investem na produção de machos ao mesmo tempo, o que pode diminuir a competição entre os machos ao saírem da colônia em busca de uma rainha receptiva.
- Apesar de ter sido observada produção de machos, muitas vezes isso ocorreu em baixas frequências. Uma possível explicação para isso seria que as colônias do experimento estivessem em fase de aclimação e estabelecimento, de modo que os recursos foram principalmente investidos em crescimento (i.e. operárias).
- Além de rainhas virgens normais, rainhas miniaturas foram observadas nas colônias (experimento 1 – verão). Essas rainhas podem consistir em um investimento de recursos da colônia em reprodução, o que deve ser analisado em conjunto com rainhas normais e machos, porém o mesmo pode não ser verdadeiro para machos gigantes, visto que seu papel na reprodução, em abelhas sem ferrão, não é conhecido.

7. Resumo

Em colônias de insetos eussociais, é prevista uma demanda conflitante entre a produção de operárias e indivíduos reprodutivos, visto que operárias realizam tarefas essenciais para a sobrevivência da colônia, enquanto machos e rainhas estão relacionados com a reprodução. Nesse trabalho, foram testadas as hipóteses (1) que a produção de sexuais estaria diretamente relacionada com a disponibilidade de recursos alimentares e (2) que haveria uma regulação temporal da produção de sexuais, com épocas mais favoráveis à produção de reprodutivos (verão) e menos favoráveis (inverno). O sistema de estudo foi a abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* e foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento, na estação de verão, foram montadas quinze colônias padronizadas e sorteadas em cinco grupos experimentais. Os grupos A2 e C2 receberam o dobro de alimentação artificial (xarope de açúcar e pólen apícola) do que os grupos A1 e C1. As colônias dos grupos C2 e C1 foram mantidas confinadas, enquanto as colônias dos grupos A2 e A1 podiam forragear livremente. O grupo A0 (controle) não recebeu alimentação artificial e as colônias permaneceram abertas. No inverno, o mesmo experimento foi realizado, porém apenas com os grupos com colônias abertas. No experimento 2, a quantidade de pólen estocado nas colônias foi manipulada. As colônias do grupo Co não foram manipuladas e apresentaram em média 44 potes de pólen, as colônias do grupo A receberam em média 96 potes e as colônias do grupo B, 12 potes. No experimento 1, para o verão, foi encontrado um efeito significativo do confinamento, porém, nas duas estações, não houve efeito da quantidade de alimento sobre a produção de sexuais. Nas duas estações, verificou-se grande variação dentro dos grupos e a produção de machos foi dominada por poucas colônias. Não houve diferenças em relação à produção de sexuais entre as estações. No inverno, a produção de machos e células reais foi correlacionada positivamente com a quantidade de potes de alimento nas colônias. No experimento 2, apesar das diferenças iniciais quanto ao alimento armazenado, houve uma rápida recuperação dos estoques de alimento, principalmente pelo grupo B. Não foi verificada diferença na produção de sexuais devido ao tratamento experimental, porém, a produção de machos foi correlacionada com o número de potes de pólen nos ninhos, como no experimento 1. Considerando esses resultados em conjunto, não foi possível refutar as hipóteses de efeito positivo da quantidade de recursos alimentares e de efeito da sazonalidade sobre a produção de sexuais em *S. aff. depilis*.

8. Abstract

In colonies of eusocial insects, it is expected a trade-off in resource allocation between worker and sexual offspring production, as workers perform tasks essential to colony's survival, while males and queens are associated with reproduction. In this study, we tested the following hypotheses: (1) that sexual offspring production would be directly related to food resources availability and (2) that there would be a temporal regulation of sexual offspring production, with a favorable season to reproductives production (summer) and a less favorable season (winter). The study system was the stingless bee *Scaptotrigona* aff. *depilis* and two experiments were conducted. In the first experiment, in summer, fifteen standardized colonies were set up and randomly assigned into five groups. Groups A2 and C2 received twice the amount of artificial food (sugar syrup and *Apis mellifera* pollen) than colonies from groups A1 and C1. Colonies from groups C2 and C1 were kept confined, while colonies from groups A2 and A1 could forage freely. The control group A0 did not receive any artificial food and the colonies remained open. In the winter the same experiment was carried out, only with groups with open colonies. In experiment 2, the amount of pollen stored in the colonies was manipulated. The colonies of group Co were not manipulated and presented a mean number of 44 pots of pollen, colonies from group A received 96 pots and colonies from group B 12 pots (mean). In summer (experiment 1), there was a significant effect for confinement, however for both seasons, there was no effect for food amount on sexual offspring production. For both seasons, there was a large intra-group variation and a few colonies were responsible for major male production. There was no difference on sexual offspring production between seasons. In winter, the production of males and royal cells was positively correlated with the amount of food pots in the colonies. In experiment 2, even though there was an initial difference in relation to food stores, a fast recovery on food storage was observed, specially for group B. There was no difference on sexual offspring production due to experimental treatment, however male production was correlated with the number of pollen pots, as in experiment 1. Considering these results together, it was not possible to refute the hypotheses of the positive effect of amount of food resources and the effect of seasonality on the production of sexual offspring in *S. aff. depilis*.

9. Referências bibliográficas

- ALVES, D.A. 2004. Produção de operárias, rainhas e machos em *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Apidae, Meliponini), Monografia Univ. Presbit. Mackenzie, São Paulo.
- ALVES, D.A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & SANTOS-FILHO, P.S. 2009. Production of workers, queens and males in *Plebeia remota* colonies (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), a stingless bee with reproductive diapauses. *Genetics and Molecular Research* 8 (2): 672-683.
- BEGO, L.R. 1977. Aspectos da regulação social em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de doutorado. Ribeirão Preto.
- 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.
- BEGO, L.R. 1990. On social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille, with special reference to productivity of colonies (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 34: 721-738.
- BEIG, D. 1972. The production of males in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. *Journal of Apicultural Research* 11: 33-39.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.M.R. 2012. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em 16 de maio de 2013.
- CAPPELARI, F.A.; TURCATTO, A.P.; MORAIS, M.M. & DE JONG, D. 2009. Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). *Genetics and molecular research* 8 (4): 1245-1249.
- CHINH, T.X. & SOMMEIJER, M.J. 2005. Production of sexuals in the stingless bee *Trigona (Lepidotrigona) ventralis flavibasis* Cockerell (Apidae, Meliponini) in northern Vietnam. *Apidologie* 36: 493-503.
- CHINH, T.X.; GROB, G.B.J.; MEEUWSEN, F.J.A.J. & Sommeijer, M.J. 2003. Patterns of male production in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Meliponini). *Apidologie*. v.34, n.2, p.161-170.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. 1979. Observações sobre atividades de machos de *Plebeia droryana* Driese (Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 23 (4): 177-191.

- CREMONEZ, T.M.; DE JONG, D. & BITONDI, M.M.G. 1998. Quantification of hemolymph proteins as a fast method of testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 91(6): 1284-1289.
- FARIA, L.B.; ALEIXO, K.P.; GARÓFALO, C.A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & SILVA, C.I. 2012. Foraging of *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae) in an Urbanized Area: Seasonality in Resource Availability and Visited Plants. *Psyche* (Cambridge, 1874), 2012:1-12.
- FERREIRA-JR, N.T.; BLOCHTEIN, B & SERRÃO, J.E. 2012. Seasonal production and spatial distribution of *Melipona bicolor schenki* (Apidae; Meliponini) castes in brood combs in southern Brazil. *Apidologie*, 44(2): 176-187.
- FRETWELL, S.D. 1972. *Populations in a seasonal environment. Monographs in population biology*, 5. Princeton University Press. 217pp.
- 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(3): 475-485.
- HOFSTEDE, F.E. & SOMMEIJER, M.J. 2006. Effect of food availability on individual foraging specialisation in the stingless bee *Plebeia tobagoensis* (Hymenoptera, Meliponini). *Apidologie*, 37: 387-397.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & KLEINERT, A.M.P. 1998. Worker reproduction in the stingless bee *Friesella schrottkyi* (Apidae, Meliponinae). *Entomologia Generalis* 23(3): 169-175.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; OLIVEIRA, M.A.C. 1976. Observations in a queenless colony of *Plebeia saiqui* (Friese) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo*, 1: 299-312.
- KLEINERT, A.M.P. & PIVA, L.F. 1992. Período de desenvolvimento em *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae, Meliponinae) *Ciência. & Cultura*, 44:838, Suplemento 7.
- KOEDAM, D. 1999. Production of queens, workers and males in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae): patterns in time and space. *Netherlands Journal of Zoology*, 49(4):289-302.
- KOEDAM, D. 2003. A non-invasive method for sampling *Melipona* brood combs and determining caste and sex ratios. In: *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure* (G.A.R. Melo e I. Alves-dos-Santos, Eds.), Editora UNESC, Criciúma, 320p.
- KOEDAM, D.; CONTRERA, F.A.L.; FIDALGO, A. O. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2005. How queen and workers share in male production in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini). *Insectes sociaux* 52: 114-121.
- KOFFLER, S. & KLEINERT, A.M.P. 2011. Influência da quantidade de recursos alimentares na reprodução de *Tetragonisca angustula* Latreille (Apidae, Meliponini). 19º SIICUSP - Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, Ribeirão Preto, SP.

- KOFFLER, S. & KLEINERT, A.M.P. 2012. Queenless colonies of *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) and the production of giant males. *Anais do X Encontro sobre Abelhas*, 2012:187.
- KNOLL, F.R.N. 1990. Abundância relativa, sazonalidade e preferências florais de Apidae (Hymenoptera) em uma área urbana. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- KOLMES, S.A. & SOMMEIJER, M.J. 1992. Ergonomics in stingless bees: changes in intranidal behavior after partial removal of storage pots and honey in *Melipona favosa* (Hym. Apidae, Meliponinae). *Insectes sociaux*, 39:215-232.
- LUZ, G.F.; SOUSA, F.G. & LACERDA, L.M. 2011. Padrão de desenvolvimento ovariano de operárias de *Scaptotrigona* aff. *postica* em colônias com diferentes dinâmicas de produção de machos (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Congresso de Ecologia do Brasil.
- MICHENER, C.D. 1974. *The social behavior of the bees – a comparative study*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 404p.
- MOO-VALLE, H.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G. & WENSELLERS, T. 2001. The effect of food reserves on the production of sexual offspring in the stingless bee *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini). *Insectes sociaux* 48: 398-403.
- MORAIS, M.M.; NASCIMENTO, F.S.; PEREIRA, R.A. & BEGO, L.R. 2006. Colony internal conditions related to caste production in *Melipona compressipes fasciculata* (Apidae, Meliponini). *Insectes sociaux* 53: 65-268.
- MORAIS, M.M., TURCATTO, A.P., FRANCOY, T.M., GONÇALVES, L.S., CAPPELARI, F.A., DE JONG, D. Evaluation of inexpensive pollen substitute diets through quantification of hemolymph proteins. *Journal of Apicultural Research* (in press).
- NOGUEIRA-NETO, P. 1997. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*. São Paulo, SP: Ed. Nogueirapis.
- ODA, G.A.; BELLUSCI, S. & MARQUES, M.D. 2007. Daily rhythms related to distinct social tasks inside a eusocial bee colony. *Chronobiology International* 24 (5): 845–858.
- OSTER, G.F. & WILSON, E.O. 1978. *Caste and Ecology in the Social Insects*. Princeton University Press, Princeton 352 pp.
- PAULINO-NETO, H.F., TURCATTO, A.P., MORAIS, M.M., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., GARÓFALO, C.A. 2010. Análise da metodologia para verificação do teor proteico de grãos de pólen utilizando-se a técnica de bradford. *Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Entomologia – Natal*.
- 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.
- PETERS, J.M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; QUELLER, D.; ROUBIK, D.W. & STRASSMANN, J.E. 1999. Mate number, kin selection and social conflicts in the

- stingless bees and honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London - B (Biological Sciences)*, 266:379-384.
- RATNIEKS, F.L.W. 2001. Heirs and spares: caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 5:467-473.
- REUTER, M. & KELLER, L. 2001. Sex ratio conflict and worker production in eusocial Hymenoptera. *The American Naturalist*, 158(2):166-177.
- RIBEIRO, M.F.; WENSELEERS, T.; SANTOS FILHO, P.S. & ALVES, D.A. 2006. Miniature queens in stingless bees: basic facts and evolutionary hypotheses. *Apidologie* 37: 191-206.
- ROUBIK, D.W. 1982. Seasonality in colony food storage, brood productions and adult survivorship: studies of *Melipona* in Tropical Forest (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 55(4):789-800.
- SANTOS-FILHO, P.S.; ALVES, D.A.; ETEROVIC, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & KLEINERT, A.M.P. 2006. Numerical investment in sex and caste by stingless bees (Apidae: Meliponini): a comparative analysis. *Apidologie* 37: 207-221.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R & ALMEIRA, E.A.B. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Ed. do autor, Belo Horizonte. 253pp.
- SOKAL, R. & ROHLF, F.J. 1995. *Biometry – The principles and practice of Statistics in biological research*. New York, W. H. Freeman & Co. 887p.
- SOMMEIJER, M.J.; DE BRUJIN, L.L.M.; MEEUWSEN, F.J.A.J. & MARTENS, E.P. Natural patterns of caste and sex allocation in the stingless bees *Melipona favosa* e *M. trinitatis* related to worker behaviour. *Insectes Sociaux*, 50(2):38-44.
- SOUSA, V.C. & KLEINERT, A.M.P. 2006. Substituição de rainha e razão sexual em *Plebeia remota* Holmberg (Apidae, Meliponini): um estudo de caso. Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia.
- TAUBER, M.J.; TAUBER, C.A. & MASAKI, S. 1986. *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press, New York. 414pp.
- TÓTH, E.; QUELLER, D.C.; DOLLIN, A. & STRASSMANN, J.E. 2004. Conflict over male parentage in stingless bees. *Insectes sociaux* 51: 1-11.
- VAN BENTHEM; F.D.J.; IMPERATRIZ-FONSECA; V.L. & VELTHUIS; H.H.W. 1995. Biology of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg): observations and evolutionary implications. *Insectes sociaux* 42:71-87.
- VAN VEEN, J.W.; ARCE, H. & SOMMEIJER, M.J. 1992. Brood production of *Melipona beecheii* in relation do dry season foraging: 81-87. In: BILLEN, J. (Ed.). *Biology and evolution of social insects*. Leuven University Press, Leuven.
- VAN VEEN, J.W. & SOMMEIJER, M.J. 2000. Observations on gynes and drones around nuptial flights in the stingless bees *Tetragonisca angustula* and *Melipona beecheii* (*Melipona*). *Apidologie* 31: 47-54.

- VAN VEEN, J.W.; ARCE ARCE, H.G. & SOMMEIJER, M.J. 2004. Production of queens and drones in *Melipona beecheii* (Meliponini) in relation to colony development and resource availability. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society* 15: 35-39.
- 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.
- VOLLET NETO, A.; MENEZES, C. 7 IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2010. Confinamento de colônias aumenta a taxa de produção de células de cria, em Mandaguari (*Scaptotrigona* aff. *depilis*). *XVIII Congresso Brasileiro de Apicultura e IV de Meliponucultura*, Cuiabá, MT.
- WENSELEERS, T.; ALVES, D.A.; FRANCOY, T.M.; BILLEN, J. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2010 Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Biology Letters*, 7:173-176.
- WILSON, E.O. 1971. *The insect societies*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 548p.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. 4 ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 663p.
- ZAYED, A. & PACKER, L. 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *PNAS*, 102 (30): 10742–10746.
- ZUCCHI, R.; SILVA-MATOS, E.V.; NOGUEIRA-FERREIRA, F.H. & AZEVEDO, G.G. 1999. On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees – nomenclature reappraisal and evolutionary considerations. *Sociobiology* 34(1): 65-86.