

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Produção “*in vitro*” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia*
(Apidae: Meliponina)

Ana Rita Tavares de Oliveira Baptistella

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área: Entomologia.

RIBEIRÃO PRETO -SP
Ano 2009

ANA RITA TAVARES DE OLIVEIRA BAPTISTELLA

Produção “*in vitro*” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia*
(*Apidae: Meliponina*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Entomologia.
Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares.

RIBEIRÃO PRETO -SP
Ano 2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

BAPTISTELLA, Ana Rita Tavares de Oliveira

Título: Produção “*in vitro*” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia* (Apidae: Meliponina)

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: Entomologia.

Aprovado em: ___ / ___ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais: fonte constante
de inspiração, apoio e ensino
diário.

Dedico

AGRADECIMENTOS

É muito bom dizer **obrigada** a tantas pessoas que, neste período, em que se é acometido de tantos surtos de tristeza, euforia, incerteza, cansaço, alegria, conseguiram se manter simplesmente presente.

Ao bom Deus, que iluminou meu caminho e me amparou nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais, Paulinho e Ana, e meu irmão Nando pelo imenso amor, constante estímulo, enorme compreensão, confortável força e pelas orações.

Ao meu orientador, sempre amigo e professor, Ademilson Espencer Egea Soares, pelo apoio, entusiasmo e por me apresentar ao fantástico mundo das abelhas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), que forneceu todas as condições para que esta pesquisa fosse realizada.

À Weyder Santana, que me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica. Obrigada pelo carinho, eterna paciência e pelas valiosas orientações que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À Camila Calixto, que esteve presente em cada instante. Obrigada por ser amiga, irmã e mãe e, por me fazer acreditar que na terra existem “anjos”.

À Amanda e Aline Makert, duas amigas imprescindíveis na vida de qualquer ser humano. Obrigada por fazerem meu coração sorrir.

À Camila Maia, Vanessa, Marina e Daiana, pela amizade e pelos ótimos momentos compartilhados.

À Ivan Akatsu, que por muitas vezes além de amigo foi professor

À Mauro Prato, pelo companheirismo e pelas risadas compartilhadas em nossas viagens.

À Geusa Simone Freitas, pela simpatia, apoio e ajuda inestimável.

À Professora Luci Bego, pela atenção oferecida e pelas valiosas sugestões.

À Professora Márcia Salomão por todo apoio e zelo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Genética de Abelhas, Aline Simoneti, Omar, Paulo Emílio, Ivan, Jairo, Marcela, Vera, pelo carinho e pelos momentos de descontração.

Às encantadoras abelhinhas *Frieseomelitta varia*, pois sem elas nenhuma dessas páginas estaria completa.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

BAPTISTELLA, A. R. T. O. **Produção “*in vitro*” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia* (Apidae, Meliponina)**. 2009. 70 f. Dissertação de Mestrado (Entomologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Nas abelhas da espécie *Frieseomelitta varia*, as castas são determinadas pela quantidade de alimento ingerida pela larva em desenvolvimento, sendo que os imaturos destinados a tornarem-se rainha ingerem quantidades maiores de alimento larval do que aquelas destinadas a ser operária. Os machos por sua vez, são determinados geneticamente, independente do volume de alimento ingerido pela larva. Sabendo da importância ecológica das abelhas sem ferrão que atuam na manutenção da diversidade de plantas nativas e como agentes polinizadores, o conhecimento da biologia e o aprimoramento de técnicas de produção que visem ampliar o número de colônias destas abelhas são necessários para a preservação destas espécies e da biodiversidade a ela associada, portanto este trabalho teve por objetivos gerais: aperfeiçoar a técnica de “produção *in vitro*” de rainhas de *F. varia* a partir da manipulação de diferentes quantidades de alimento larval; verificar a eficiência de *Frieseomelitta varia* em formar colônias diminutas; verificar a (s) época (s) de ocorrência natural de machos. O alimento larval utilizado para produção de rainhas foi coletado por sucção à vácuo de células de cria recém operculadas e posteriormente, diferentes quantidades de alimento (25, 30, 35, 40 e 50 μ l) foram oferecidos às larvas em fase pré-defecante. As rainhas nascidas foram introduzidas em colônias órfãs com algumas operárias jovens, alimento e pólen e foram acompanhadas diariamente para verificar seu desenvolvimento. A produção natural de machos foi verificada através de coletas mensais de pupas, analisando seu aparelho reprodutor sob lente de aumento. Encontramos um volume médio de $26,70 \pm 3,55$ μ l de alimento por célula de operária de *Frieseomelitta varia*. A estimativa da taxa de crescimento da cápsula cefálica das larvas, $K=1,37$ e o coeficiente de determinação (R^2) de 0,98, resultou na presença de quatro instares larvais, assim as 339 larvas transferidas apresentavam cápsula entre 0,866 e 1,143 mm. Nos experimentos em que foram fornecidas às larvas quantidades de alimento de 30 e 40 μ l (dezembro/fevereiro e abril/julho), houve uma maior frequência de larvas diferenciadas em rainha. Os experimentos de maio e outubro (35 μ l), apesar da taxa de mortalidade das larvas ter sido elevada, todas as larvas nascidas se diferenciaram em rainha, já no experimento realizado em agosto (50 μ l), houve mortalidade total das larvas (n=32). As 56 rainhas produzidas foram introduzidas em mini-colônias e verificamos uma alta taxa de mortalidade das rainhas pelas operárias (77%). Quanto à ocorrência de machos, a frequência de células com machos prestes a nascer variou de 4% em outubro e setembro a 46 % em janeiro e 45 % em dezembro e julho. Verificamos que o volume total médio de alimento necessário para a diferenciação de uma larva jovem de *F. varia* em rainha é de $59,20 \pm 5,00$ μ l, ou seja, a rainha consome 2,23 vezes mais alimento que a operária. Alguns elementos interferiram no sucesso das rainhas produzidas, no entanto, algumas rainhas (n=6) se estabeleceram como fêmea dominante. Os dados de ocorrência de machos mostram que a produção de machos nas colônias, embora ocorra durante todo ano, ocorre com maior ou menor intensidade em determinadas épocas.

Palavras-chave: abelha sem ferrão, produção de rainha, machos, alimento larval.

ABSTRACT

BAPTISTELLA, A. R. T. O. **Production “*in vitro*” of queens and natural occurrence of males of *Frieseomelitta varia* (Apidae, Meliponina)**. 2009. 70 f. Dissertação de Mestrado (Entomologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

In *Frieseomelitta varia* bees species, the castes are determined by the amount of food ingested by the larvae in development, being the immature ones destined to become queen, ingest larger amount of larval food than those destined to be workers. The males ones, in their turn, are genetically determined independently from the food volume ingested by the larvae. Knowing about the ecological importance of the stingless bees that act in the maintenance of the diversity of native plants and as pollinating agents, the knowledge of the biology and the improvement of production techniques that seek to enlarge the number of colonies of these bees are necessary for the preservation of these species and the biodiversity associated to it. Therefore, the general aim of this work were: to improve the technique of "*in vitro production*" of *F. varia* queens starting from the manipulation of different amounts of larval food; to verify the efficiency of *Frieseomelitta varia* to form tiny colonies and verify the period (s) of natural occurrence of males. The larval food used for production of queens was collected by vacuum suction of cells recently covered, and later different amount of food (25, 30, 35, 40 and 50 μ l) were offered to the larvae in pre-defecating phase. The born queens were introduced in orphan colonies with some young workers, food and pollen and were accompanied daily to verify their development. The natural production of males was verified through monthly collections of pupae, analyzing its reproductive system under magnifying glass. We found an average volume of 26.70 ± 3.55 μ l of food per worker cell of *Frieseomelitta varia*. The estimate rate growth of the cephalic capsule of the larvae, $K=1.37$ and the determination coefficient (R^2) of 0.98, resulted in the presence of four instar larvae, thus, the 339 transferred larvae, presented capsule between 0.866 and 1.143 mm. In the experiments in which the larvae amount of food of 30 and 40 μ l (december/february and april/july) were supplied, there was a larger frequency of larvae differentiated into queen. The experiments of may and october (35 μ l), in spite of the mortality rate of the larvae being raised, all of the born larvae differentiated into queen, whereas in the experiment carried out in august (50 μ l), there was total mortality of the larvae (n=32). The 56 produced queens were introduced in colonies and it was recorded a high mortality rate of the queens by the workers (77%). As for the occurrence of males, the frequency of cells with ready to be born males varied from 4% in october and september to 46% in January and 45% in december and july. We verified that the total average volume of necessary food for the differentiation of a young larva of *F. varia* in queen is of $59.20 \pm 5,00$ μ l, in other words, the queen larvae consumes 2.23 times more food than the workers one. Some elements interfered in the success of the queens produced, but, some queens (n=6) established themselves as dominant female in the new colonies. The data of occurrence of males show that the production of males in colonies, although it happens during the whole year, happens with larger or smaller intensity in certain periods.

Key-words: stingless bee, queen production, males, larval food.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Mecanismos de determinação das castas nas abelhas da subtribo Meliponina. **a)** espécies do gênero *Melipona*; **b)** abelhas dos demais gêneros; **c)** algumas espécies dos gêneros *Leurotrigona*, *Frieseomelitta* e *Plebeia*.....15
- FIGURA 2 - Células de cria das espécies *Frieseomelitta varia* (A) e *Plebeia lucii* (B) agrupadas na forma de cacho.....16
- FIGURA 3 - Célula típica de rainha de *Frieseomelitta varia* (círculo): célula auxiliar com alimento extra (a); célula com a larva jovem (b).....16
- FIGURA 4 - Vista interna de uma das colônias de *Frieseomelitta varia* utilizada no experimento. Observar a quantidade de células de cria (A), de potes de mel (B) e potes de pólen (C).....22
- FIGURA 5 - (A) Instrumentação para coleta de alimento larval por sucção, I – bomba de sucção a vácuo, II - recipiente de vidro para coleta de resíduos, III – tubo Falcon mantido em recipiente com gelo, IV – ponteira de micropipeta acoplada à mangueira para a sucção do alimento, V – tampa da placa de Petri para acomodar as células de cria. (B) Detalhe do tubo Falcon coletor de alimento; (C) Detalhe da ponteira de micropipeta e tampa de placa de Petri.....23
- FIGURA 6 - Alimento larval de células de cria de *Frieseomelitta varia* sendo transferido para a placa de Elisa.....24
- FIGURA 7 - (A) Recipiente plástico protegido por filme de PVC, contendo a placa de Elisa com alimento e as larvas transferidas, solução saturada de água e NaCl (seta); (B) Todo conjunto foi envolto em papel laminado.....25
- FIGURA 8 - Rainha de *Frieseomelitta varia* produzida *in vitro* após o nascimento, com marcação no mesonoto indicada pela seta.....25
- FIGURA 9 - Variação do volume de alimento larval em células de cria de *Frieseomelitta varia*, durante os meses de coleta.....29
- FIGURA 10 - Variação do volume total de alimento larval nos alvéolos de *Frieseomelitta varia* nas diferentes épocas de coleta dos dados (época seca/chuvosa).....30
- FIGURA 11 - Curva de distribuição de freqüência da largura das cápsulas cefálicas (mm) de larvas de *Frieseomelitta varia* (n=494).....32

FIGURA 12 -	Detalhe do último par de pernas dos adultos nascidos do experimento realizado em dezembro (30µl de alimento larval). A: Operária, B: Rainha, C: indivíduo com características intermediárias entre rainha e operária.....	35
FIGURA 13 -	Fatores responsáveis pela alta mortalidade das rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> produzidas <i>in vitro</i>	36
FIGURA 14 -	Gaiola dentro da qual as rainhas produzidas foram mantidas isoladas das operárias da mini-colônia. Detalhe da tela com fragmentos de cerume que a cobriam.....	37
FIGURA 15 -	A) Mini-colônia com rainha produzida “ <i>in vitro</i> ” (círculo), B) detalhe da rainha marcada e fecundada. A seta evidencia o abdômen desenvolvido da rainha marcada.....	38
FIGURA 16 -	Célula de aprisionamento com rainha virgem de <i>Frieseomelitta varia</i>	39
FIGURA 17 -	Colônia experimental para <i>Frieseomelitta varia</i> , construída em módulos de madeira e laterais de vidro. A) Vista lateral; B) Vista frontal; C) Vista interna da colônia, D) Detalhe interno dos módulos preenchidos.....	39
FIGURA 18 -	Frequência relativa (%) de machos e operárias de <i>Frieseomelitta varia</i> coletados em 1784 células de cria em três colônias distintas ao longo de 12 meses.....	43
FIGURA 19 -	Frequência relativa (%) de machos (VERMELHO) e operárias (PRETO) por mês de amostragem em cada uma das três colônias de <i>Frieseomelitta varia</i> . Colônia 1 (A), Colônia 2 (B) e Colônia 3 (C).....	44
FIGURA 20 -	Frequência de machos de <i>Frieseomelitta varia</i> , em estágio de pupa, nos meses de coleta dos dados (12 meses). As marcações em vermelho indicam os meses em que as rainhas produzidas foram fecundadas (n=6).....	55



LISTA DE TABELAS

TABELA I -	Volumes médios de alimento larval coletado em relação ao número de células analisadas em <i>Frieseomelitta varia</i>	29
TABELA II -	Volumes médios de alimento larval em células de cria de <i>Frieseomelitta varia</i> em diferentes estações do ano e comparação das médias pelo teste Z.....	31
TABELA III -	Número de ínstaes larvais em <i>Frieseomelitta varia</i> , amplitude, média da largura da cápsula cefálica (mm) e intervalo de confiança (IC).....	32
TABELA IV -	Desenvolvimento <i>in vitro</i> das larvas de <i>Frieseomelitta varia</i>	33
TABELA V -	Diferentes quantidades de alimento larval oferecidos às larvas para produção de rainhas <i>in vitro</i> de <i>Frieseomelitta varia</i>	34
TABELA VI -	Rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i> produzidas <i>in vitro</i> , introduzidas e aceitas nas mini-colônias.....	36
TABELA VII -	Peso (g) das rainhas produzidas em condições naturais e das rainhas produzidas em laboratório que se estabeleceram nas mini-colônias.....	40
TABELA VIII -	Teste-t: Comparação do peso ao nascer entre as rainhas naturais (N) e rainhas produzidas em condições controladas (P) que se estabeleceram nas mini-colônias.....	41
TABELA IX -	Teste-t: Comparação do peso ao nascer entre as rainhas naturais (N) e rainhas produzidas <i>in vitro</i> que morreram (Pm).....	41
TABELA X -	Frequência de machos e operárias em três colônias naturais de <i>Frieseomelitta varia</i> em diferentes épocas do ano.....	41
TABELA XI -	Meses nos quais ocorreu a fecundação das rainhas de <i>Frieomelitta varia</i> produzidas <i>in vitro</i>	54

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO	11
II- OBJETIVOS.....	18
III- MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Quantificação do volume de alimento larval em células de cria de <i>Frieseomelitta varia</i>	21
3.2. Determinação do número de ínstars larvais em <i>Frieseomelitta varia</i>	21
3.3. Produção <i>in vitro</i> de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i>	22
3.3.1. Coleta e estocagem do alimento larval.....	22
3.3.2. Transferência das larvas de <i>Frieseomelitta varia</i> para placas de cultivo celular.....	23
3.4. Montagem e desenvolvimento de mini-colônias de <i>Frieseomelitta varia</i> utilizando-se rainhas produzidas <i>in vitro</i>	25
3.5. Ocorrência de machos em colônias naturais de <i>Frieseomelitta varia</i>	27
VI- RESULTADOS.....	28
4.1. Quantificação do volume de alimento larval em células de cria de <i>Frieseomelitta varia</i>	29
4.2. Determinação do número de ínstars larvais em <i>Frieseomelitta varia</i>	31
4.3. Produção <i>in vitro</i> de rainhas de <i>Frieseomelitta varia</i>	33
4.3.1 Possível ocorrência de intercasta.....	34
4.4. Mini-colônias de <i>Frieseomelitta varia</i> utilizando as rainhas produzidas <i>in vitro</i>	35
4.5. Ocorrência de machos em colônias naturais de <i>Frieseomelitta varia</i>	40
V- DISCUSSÃO.....	45
VI- CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

I- INTRODUÇÃO

As abelhas pertencem à família Apidae e à subfamília Apinae (Michener, 1974) e são representadas por um grupo muito diversificado, apresentando 17 tribos dentre as quais 13 estão representadas no Brasil (Silveira *et al.*, 2002). Todos os Apidae apresentam algum grau de organização social, no entanto, os indivíduos das subtribos Apina e Meliponina (Silveira *et al.*, 2002) possuem o comportamento social mais elaborado entre as abelhas (Michener, 1974; 2000; Sakagami, 1982; Wille, 1983; Winston, 1991).

A socialidade pressupõe a existência de uma organização entre os indivíduos pertencentes à mesma colônia, que cooperam com o cuidado da cria e dividem o trabalho no ninho (Wilson, 1971).

Nos insetos sociais em geral, o desenvolvimento das castas está relacionado com um amplo fenômeno de polimorfismo (Nijhout & Wheeler, 1982) que nas abelhas envolve a população feminina (rainhas e operárias), apresentando diferenças acentuadas quanto à divisão de trabalho dentro da colônia. O desenvolvimento de operárias e rainhas diverge do ponto de vista morfológico e fisiológico, culminando em adultos que diferem também em suas características comportamentais (Weaver, 1966; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990).

As rainhas possuem função exclusivamente reprodutiva, copulam com os machos e passam o resto de seus dias realizando a postura de ovos. Sua presença na colônia é fundamental, garantindo a integridade e funcionalidade da sociedade. Quanto às operárias, elas são responsáveis pela manutenção da colônia realizando diversas atividades, tais como, cuidado com a prole, coleta de alimento, construção e defesa do ninho, limpeza e provisionamento das células de cria, dentre outras (Michener, 1974; Laidlaw, 1992; Page & Peng, 2001).

Em uma colônia de abelha eussocial são produzidos além da rainha e das operárias, indivíduos do sexo masculino. Normalmente, alguns dias após emergirem, os machos são expulsos da colônia pelas operárias (Michener, 1948; Kerr *et al.* 1996) e têm como função principal fecundar a rainha virgem durante o vôo nupcial. Entretanto, alguns autores observaram machos de espécies de meliponíneos realizando algumas tarefas dentro da colônia envolvendo atividades de construção, trofaláxis, desidratação de néctar (Imperatriz-Fonseca, 1973; Cortopassi-Laurino, 1979) e algumas atividades relacionadas à defesa do ninho (Kerr, 1990).

As atividades desenvolvidas pelos machos é assunto a ser investigado com mais afinco, uma vez que não há evidências suficientes que comprovem estes comportamentos. Para alguns autores, estas atividades são meramente acidentais (Nogueira-Neto, 1997). Até o momento, não há evidências de que a atividade de desidratação do néctar pelos machos

contribua de qualquer forma como uma vantagem para a colônia (Cortopassi-Laurino, 2007). Assim, de acordo com Velthuis e colaboradores (2005), a produção de machos é um investimento que está em conflito com o investimento no tamanho da colônia, pois ao contrário das operárias, a maioria dos machos não participa das atividades regulares da colônia.

Dentre as diferenças morfológicas entre rainhas e operárias podem-se observar, por exemplo: sistema reprodutor desenvolvido com ovários com maior número de ovariolos em rainhas (Michener, 1974) e a presença de corbícula, estrutura encontrada na tíbia das pernas posteriores de todos os Apidae (Michener, 1999), formada por uma cavidade envolvida por várias cerdas ou pêlos (Snodgrass, 1956), que é mais elaborada nas operárias e está relacionada com a coleta de pólen e resina (Thorpe, 1979).

Os insetos da subtribo Meliponina que compreendem as abelhas do gênero *Melipona* e todos os demais gêneros (Silveira *et al.*, 2002), são conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão, abelhas indígenas ou meliponíneos, por apresentarem seu acúleo (ferrão) atrofiado (Nogueira-Neto, 1997). São insetos sociais de grande diversidade e de ampla distribuição geográfica (Sakagami, 1982; Roubik, 1989), podem ser encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, mas sua maior diversidade é observada nas regiões Neotropicais (com mais de 300 espécies descritas) e na região Indo-Malaia (com cerca de 60 espécies), sendo que certos táxons são restritos às regiões tropicais e subtropicais do hemisfério sul (Camargo, 1989; Camargo & Pedro, 1992). No Brasil, essa subtribo é bastante representativa e já foram descritas aproximadamente 192 espécies pertencentes a 27 gêneros (Silveira *et al.*, 2002).

Segundo Koedam (1995), na maioria dos insetos eussociais a seleção natural favoreceu o surgimento de uma plasticidade comportamental, que permite às operárias serem capazes de realizar qualquer comportamento inerente às fêmeas daquela espécie, exceto a postura de ovos fecundados e, a adaptação dos ovários das rainhas, relacionada às altas taxas de oviposição, é uma especialização que está acompanhada por uma mudança morfológica/fisiológica, limitando o desempenho de outros comportamentos. Entretanto, segundo Bourke (1988) esta especialização não transforma os outros grupos de fêmeas, como as operárias, em uma casta completamente estéril.

As operárias do gênero *Apis* podem ter seus ovários desenvolvidos durante a ausência da rainha ou quando a população é muito grande (Groot & Voogd, 1954). Nos meliponíneos a situação é mais complexa. Em algumas espécies, por exemplo, em *Leurotrigona muelleri*, assim como em *Apis mellifera* as operárias têm seus ovários diferenciados apenas na ausência da rainha (Sakagami & Zucchi, 1966; Cruz-Landim, 2000), entretanto, em algumas espécies

as operárias apresentam ovários desenvolvidos (ativos) e produzem ovos mesmo na presença da rainha (Sakagami *et al.*, 1963). Estas operárias podem produzir dois tipos de ovos : 1) reprodutivos, que contribuem com a produção de machos da colônia (Beig, 1972; Machado *et al.*, 1984; Imperatriz-Fonseca & Kleinert, 1998; Sommeijer *et al.*, 1999; Koedam *et al.*, 2001; Tóth *et al.*, 2002; Chinh *et al.*, 2003; Paxton *et al.*, 2003; Tóth *et al.*, 2004); 2) ovos tróficos, que são ingeridos pela rainha antes da postura de seus ovos (Silva *et al.*, 1972; Contel, 1976; Bego, 1982; 1990; Sommeijer & van Buren, 1992; Koedam *et al.*, 2005).

De acordo com Zucchi *et al.* (1977;1999) as operárias de colônias sociais avançadas geralmente se mantêm estéreis, como pode ser observado em algumas espécies tais como *Duckeola ghiliani* (Sakagami & Zucchi, 1968), *Tetragonula laeviceps* (Sakagami *et al.*, 1983), *Tetragonula minangkabau* (Suka & Inoue, 1993), incluindo espécies do gênero *Frieseomelitta* (Suka & Inoue, 1993; Zucchi *et al.*, 1999; Boleli *et al.*, 1999; 2000; Cruz-Landim, 2000).

Os mecanismos de determinação de castas nas abelhas eussociais dependem, direta ou indiretamente, da alimentação na fase larval, mesmo naquelas espécies em que os fatores genéticos podem estar envolvidos (Hartfelder *et al.*, 2006).

Em abelhas do gênero *Apis* a quantidade e a qualidade do alimento larval são fundamentais para a diferenciação de rainhas e operárias (Beetsma, 1979). As larvas que originarão rainhas recebem alimento diferenciado daquelas destinadas a se tornarem operárias. As futuras rainhas são alimentadas com geléia real durante todo o seu desenvolvimento e as operárias recebem uma mistura de mel e pólen após o terceiro dia de alimentação larval (Rembold *et al.*, 1974; Weaver, 1974; Asencot & Lensky, 1984). O processo de alimentação das larvas nas abelhas melíferas é progressivo, em virtude do fato das operárias nutridoras depositarem o alimento nas células durante visitas periódicas (Michener, 1974).

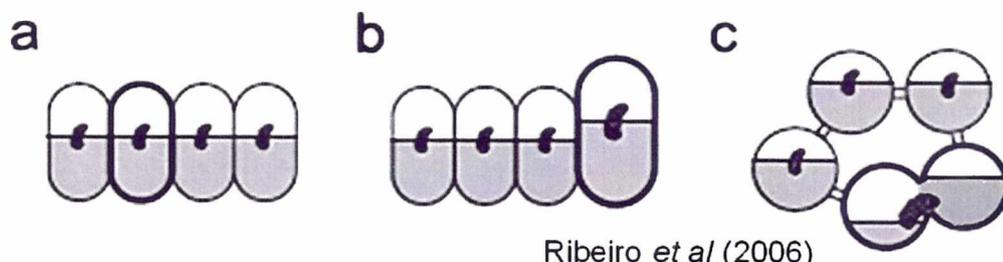
Por outro lado, nas abelhas sem ferrão, não foram encontradas diferenças qualitativas entre o alimento oferecido às larvas que originarão rainhas e aquele oferecido às larvas que originarão operárias (Kerr *et al.*, 1966; Camargo, 1972, Hartfelder & Engels, 1989). Os meliponíneos possuem um mecanismo diferente de provisão do alimento larval, que é constituído por uma secreção glandular produzida pelas glândulas hipofaríngeas das operárias nutridoras e uma mistura de pólen e mel com aproximadamente, 16% de pólen e 8% de mel (Laidlaw *et al.*, 1956; Hartfelder & Engels, 1989). Todo o alimento necessário para o desenvolvimento do imaturo é depositado na célula pelas operárias antes da postura do ovo pela rainha. Depois a célula é operculada pelas operárias e não ocorre contato entre elas e as

larvas em desenvolvimento. Este processo recebe o nome de aprovisionamento massal (Kerr, 1948; Michener, 1974; Nogueira-Neto, 1997).

Nas abelhas da subtribo Meliponina, o sistema de produção de rainha difere entre as espécies. Nas espécies do gênero *Melipona* o mecanismo de determinação das castas tem base genética (Kerr, 1950 *apud* Kerr *et al.*, 1996) modulado por influências ambientais (Kerr & Nielsen, 1966; Kerr, 1974; Engel & Imperatriz-Fonseca, 1990; Velthuis e Sommeijer, 1991). As rainhas se desenvolvem em células de mesmo tamanho das células de operárias e de machos (Kerr *et al.*, 1996) (Figura 1a). Neste gênero, a variação na quantidade de alimento associado aos mecanismos genéticos é responsável por regular o sistema de diferenciação entre rainhas e operárias (Kerr, 1950 *apud* Kerr *et al.*, 1996).

Nos demais gêneros de abelhas indígenas, a quantidade de alimento larval é o fator decisivo na determinação das castas (Camargo, 1972; Michener, 1974; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). As rainhas emergem de células de tamanho maior que as células de operárias, estas células reais ou realeiras contém uma quantidade de alimento larval maior que as demais células (Figura 1b). Deste modo, as larvas destinadas a se tornarem rainhas ingerem uma quantidade de alimento larval maior que aquele ingerido pelas larvas que irão se desenvolver em operárias (Kerr, 1948; Camargo, 1972).

No entanto, outro mecanismo diferencial de produção de rainhas pode ser observado em algumas espécies dos gêneros *Leurotrigona*, *Frieseomelitta* e *Plebeia* que contróem células de cria arranjadas na forma de cacho (Figura 2) (Michener, 1974; Nogueira-Neto, 1970; Moure, 2004, respectivamente). Nestas abelhas não ocorre construção de células reais típicas (Figura 1c), as rainhas se desenvolvem em casulos reais formados a partir da junção de duas células de cria de tamanho normal (Terada, 1974; Faustino *et al.*, 2002; Teixeira, 2007),



Ribeiro *et al* (2006)

Figura 1: Mecanismos de determinação das castas nas abelhas da subtribo Meliponina. a) espécies do gênero *Melipona*; b) abelhas dos demais gêneros; c) algumas espécies dos gêneros *Leurotrigona*, *Frieseomelitta* e *Plebeia*. Fonte: modificado de Ribeiro *et al.*, 2006.



Figura 2: Células de cria das espécies *Frieseomelitta varia* (A) e *Plebeia luciii* (B) agrupadas na forma de cacho. Fonte figura 1B: Moure, 2004.

Em *Frieseomelitta varia*, espécie estudada neste trabalho, este mecanismo de produção de rainha foi estudado por Terada (1974) e Faustino e colaboradores (2002) que demonstraram experimentalmente que as larvas que tem acesso somente ao alimento da sua célula se desenvolvem em operárias, por outro lado, aquelas que se alimentam de uma quantidade extra de alimento larval a provisionado em uma célula adjacente, diferenciam-se em rainha. Esta célula auxiliar contendo alimento, com o tamanho aproximado de uma célula normal (Figura 3), é construída pelas operárias ao lado ou acima da célula contendo a larva escolhida para tornar-se rainha (Terada, 1974; Faustino *et al.*, 2002).

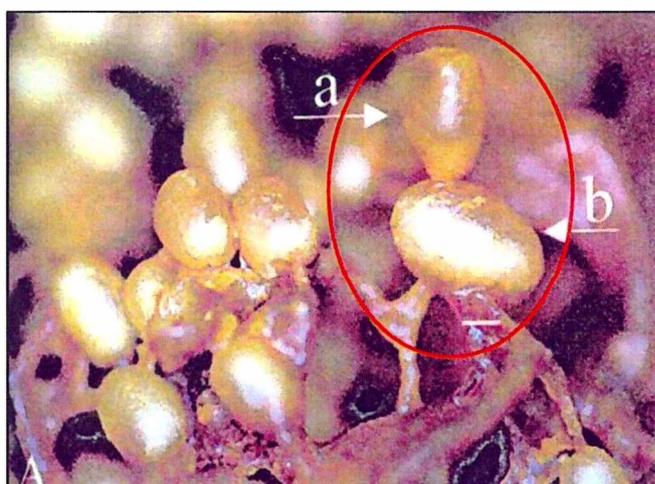


Figura 3: Célula típica de rainha de *Frieseomelitta varia* (círculo): célula auxiliar com alimento extra (a); célula com a larva jovem (b). Fonte: Faustino, 2002.

Além destes mecanismos, existem ainda alguns gêneros de meliponíneos onde as rainhas podem emergir tanto de uma célula de tamanho normal de operária quanto de células maiores ou células reais (realeiras). As rainhas produzidas em células de mesmo tamanho que as de operárias são menores que as rainhas emergidas de células reais típicas, estas rainhas são usualmente chamadas de rainhas miniaturas ou rainhas anãs (Engels & Imperatriz-

Fonseca, 1990; Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1997; Bourke & Ratnieks, 1999; Ribeiro, 2004; Wenseelers *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2006).

Atualmente, têm-se registro de ocorrência de rainhas miniaturas em nove espécies de abelha sem ferrão, entre elas: *Cephalotrigona capitata* (Schwarz, 1948); *Schwarziana quadripunctata* (Camargo, 1974; Imperatriz-Fonseca & Darakjian, 1993; Nogueira-Ferreira *et al.*, 2000; Wenseelers *et al.*, 2005), *Plebeia julianii* (Juliani, 1962), *Plebeia remota* (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1975; Ribeiro *et al.* 2003; Ribeiro *et al.*, 2006), *Nannotrigona testaceicornis* (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1997); *Plebeia lucii* (Teixeira & Campos, 2005).

Sabe-se que as abelhas sem ferrão constituem um grupo ecologicamente importante, uma vez que, salvo algumas exceções, como *Trigona crassipes* (Fabricius, 1793) e *Trigona hypogea* (Silvestri, 1902), que possuem hábitos necrófagos (Nogueira-Neto, 1997; Velthuis, 1997), apresentam uma estreita relação de dependência com as plantas, as quais fornecem o alimento para as abelhas, principalmente pólen e néctar (fontes de proteína e energia, respectivamente) e em troca recebem os benefícios da transferência de pólen (Kevan & Baker, 1983; Proctor *et al.*, 1996) atuando portanto na manutenção da diversidade das plantas como agentes polinizadores. Acredita-se, que no Brasil cerca de 40 a 90% das árvores nativas são polinizadas por abelhas sem ferrão, dependendo do ecossistema (Kerr, 1996).

Assim, a grande necessidade de se conservar as espécies de meliponíneos brasileiros reside principalmente, na ampla ação como polinizadores da nossa flora que, por sua vez, garante a presença e desenvolvimento da fauna e de toda biodiversidade (Kerr *et al.*, 1996). Da mesma forma, a conservação da flora nativa também é necessária, uma vez que a fragmentação e degradação dos ambientes naturais podem prejudicar as comunidades de abelhas nativas (Kremen *et al.*, 2002) causando a perda ou a dissociação de recursos importantes para sua alimentação e locais de nidificação (Potts *et al.*, 2005).

A importância das abelhas sem ferrão aumenta à medida que mais conhecimento se tem sobre elas. O interesse cada vez maior na sua utilização como agentes polinizadores de culturas agrícolas, na comercialização de seus produtos como o pólen, o mel, o própolis, aumenta a procura por suas colônias. Estudar a produção de machos, rainhas e operárias é o primeiro passo para possibilitar a multiplicação dos ninhos em larga escala, viabilizando sua utilização tanto ecológica como economicamente, além de possibilitar estudos sobre a biologia e a determinação de castas nos meliponíneos.

II- OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

1. Adaptar e aperfeiçoar a técnica de “produção artificial” ou “produção *in vitro*” de rainhas de meliponíneos a partir da manipulação de quantidades diferenciais de alimento larval;
2. Verificar a capacidade de *Frieseomelitta varia* em formar colônias diminutas a partir dos indivíduos obtidos pelo método de produção *in vitro*, para a multiplicação de ninhos dessa espécie;
3. Avaliar a aceitação das rainhas de *Frieseomelitta varia* produzidas em condições controladas;
4. Verificar a (s) época (s) de ocorrência natural de machos, a fim de sincronizar com a produção *in vitro* de rainhas;
5. Verificar a viabilidade reprodutiva das rainhas virgens produzidas *in vitro* introduzidas através da fecundação e início da postura.

III- MATERIAL E MÉTODOS

1. Quantificação do volume de alimento larval em células de cria de *Frieseomelitta varia*

O material biológico utilizado neste estudo foi retirado de uma colônia de *Frieseomelitta varia*, mantida em colônia racional no meliponário do Departamento de Genética da FMRP/USP. A colônia apresentava excelentes condições e foi escolhida com base na quantidade de potes de alimento, no número de células de cria e no número de operárias em atividade na colônia.

Durante os meses de maio, junho, agosto, novembro (2007), fevereiro e abril (2008), foram coletadas células de cria recém operculadas, todas contendo ovos não eclodidos em seu interior, estas células são facilmente identificáveis, pois possuem coloração mais escura que as demais e geralmente se concentram na porção superior da área de cria.

Em laboratório, sob condições assépticas e, com o auxílio de um estilete de ponta fina, as células foram desoperculadas e os ovos removidos e descartados. O alimento larval de cada célula foi coletado e quantificado volumetricamente utilizando-se uma micropipeta (10 μ l). Após o processo de extração, o alimento foi acondicionado em tubo plástico tipo Falcon e conservado em freezer à - 20°C.

Após a coleta do alimento larval, as células restantes foram devolvidas à colônia de origem para serem reutilizadas pelas operárias do ninho.

2. Determinação do número de instares larvais em *Frieseomelitta varia*

O número de instares larvais foi determinado a partir da medida da largura máxima da cápsula cefálica de 494 larvas provenientes de três colônias distintas de *Frieseomelitta varia*. Os indivíduos foram fixados inicialmente em solução de Bouin (150 ml de álcool 80%, 60 ml de solução com formol, 15 ml ácido acético glacial, 1g ácido pícrico), após 48 horas foram transferidos para álcool 70%, onde foram conservadas, para posterior análise.

As medições das cápsulas cefálicas foram feitas através de uma ocular graduada acoplada a um microscópio estereoscópio (Leica Wild M3B). As larvas com as mesmas medidas foram agrupadas em frascos tipo eppendorf contendo álcool 70% e etiquetados com os seus respectivos valores.

Os dados foram plotados em gráfico de distribuição de frequência e, utilizou-se o modelo matemático com base na regra de Dyar, conforme preconizado por Parra e Haddad

(1989), para determinação do número real de ínstares. A partir deste modelo foram obtidos a taxa de crescimento (K) e o coeficiente de determinação (R^2).

3. Produção *in vitro* de rainhas de *Frieseomelitta varia*

3.1 Coleta e estocagem do alimento larval

Para a extração do alimento larval foram retiradas células de cria recém operculadas de três colônias em condições estáveis, com grande disponibilidade de alimento e bom número de postura pela rainha, observado através da quantidade de células recém operculadas (Figura 4).

As células retiradas do ninho foram colocadas em placa de Petri e conduzidas ao laboratório, onde foram desoperculadas e os ovos removidos utilizando-se um estilete de ponta fina.



Figura 4: Vista interna de uma das colônias de *Frieseomelitta varia* utilizada no experimento. Observar a quantidade de células de cria (A), de potes de mel (B) e potes de pólen (C).

O alimento foi coletado por sucção através de um tubo de borracha de silicone de fino calibre, com uma ponteira de pipeta na extremidade, conectado a um tubo do tipo Falcon e ligado a uma bomba de vácuo (Figura 5). O tubo plástico foi mantido em uma caixa de isopor com gelo a temperatura aproximada de 4°C para não alterar as características físico/químicas do alimento durante o processo de extração.

Após a coleta do alimento, o tubo Falcon foi mantido em freezer a -20°C , onde foi mantido até a sua utilização. As células das quais os alimentos foram extraídos foram devolvidas à colônia original para reaproveitamento da cera pelas operárias.

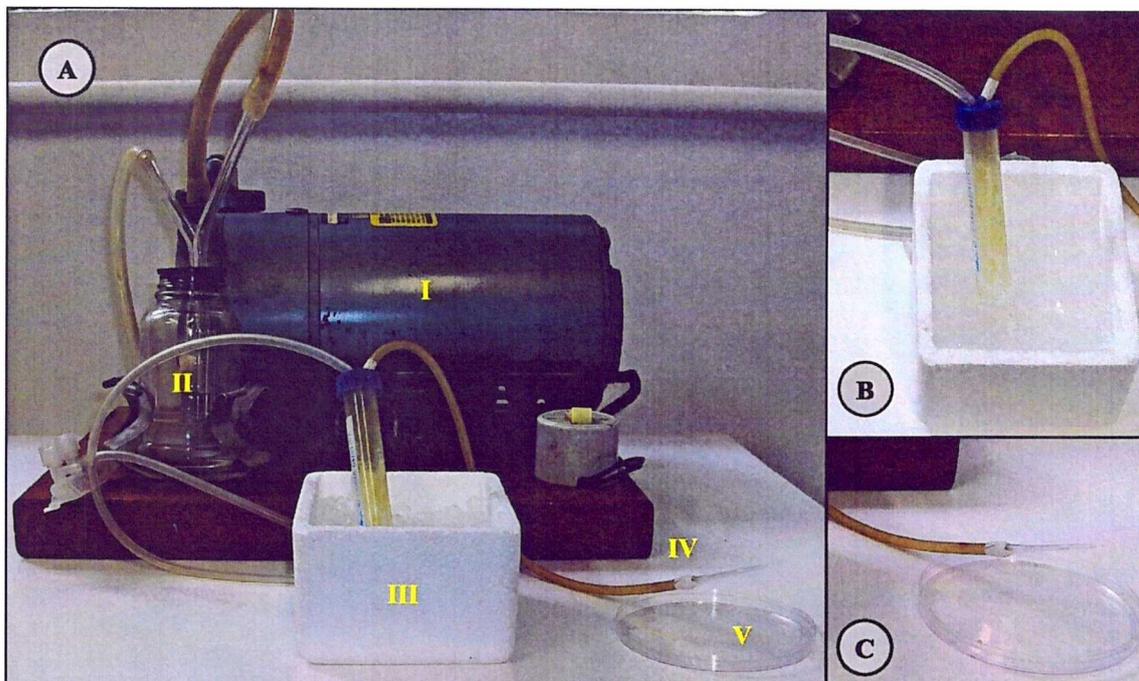


Figura 5: (A) Instrumentação para coleta de alimento larval por sucção, I – bomba de sucção a vácuo, II - recipiente de vidro para coleta de resíduos, III – tubo Falcon mantido em recipiente com gelo, IV – ponteira de micropipeta acoplada à mangueira para a sucção do alimento, V – tampa da placa de Petri para acomodar as células de cria. (B) Detalhe do tubo Falcon coletor de alimento; (C) Detalhe da ponteira de micropipeta e tampa de placa de Petri.

3.2. Transferência das larvas de *Frieseomelitta varia* para placas de cultivo celular

Para a realização dos experimentos envolvendo a transferência das larvas, o alimento previamente coletado (ver item 3.1) foi descongelado gradualmente em um recipiente de isopor com gelo e posteriormente homogeneizado com o auxílio de um agitador elétrico.

Em uma placa de Elisa esterilizada (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) com 96 pocinhos, medindo: 0,7 mm de diâmetro, 1 cm de profundidade e volume total de 400 μl (Figura 6), o alimento foi transferido com uma micropipeta Gilson em diferentes concentrações (25, 30, 35, 40 e 50 μl), suficientes para que as larvas se desenvolvessem em rainhas.

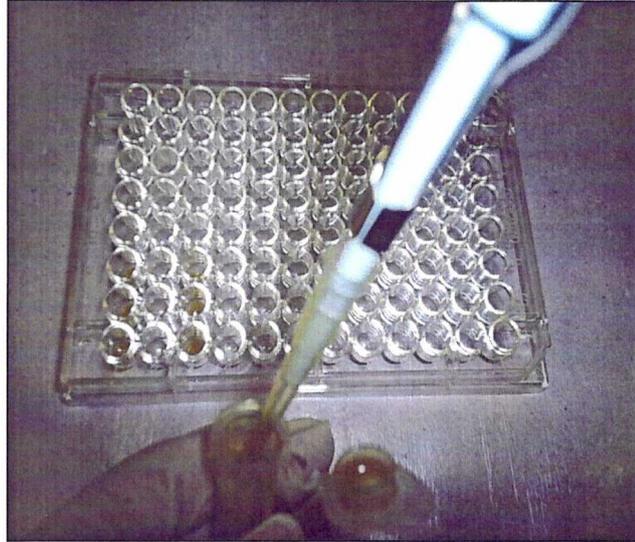


Figura 6: Alimento larval de células de cria de *Frieseomeilta varia* sendo transferido para a placa de Elisa.

Das mesmas colônias das quais foram retiradas as células para extração do alimento larval, foram selecionadas e coletadas células de cria velha, as quais foram abertas uma a uma com o auxílio de pinça de ponta fina, para a seleção das larvas na fase de alimentação para posterior transferência.

Foram selecionadas larvas no último estágio de alimentação (pré-defecante), ou seja, haviam ingerido completamente o conteúdo de sua célula, porém não iniciaram o processo de defecação, apresentando coloração branca-leitosa e o intestino repleto com alimento.

Tais larvas foram imediatamente transferidas para a placa de Elisa, depositadas cuidadosamente sobre o alimento, utilizando-se uma pinça com ponta arredondada, tomando o cuidado necessário para não perfurar a larva.

As placas tipo Elisa contendo as larvas transferidas foram acondicionadas no interior de recipientes plásticos com tampa (*Tupperware*) com uma solução de NaCl saturada em seu interior para manter a umidade relativa em torno de 75%. Os recipientes foram envolvidos com filme de PVC mantendo as condições de umidade interna e com papel laminado a fim de evitar a luminosidade externa (Figura 7).

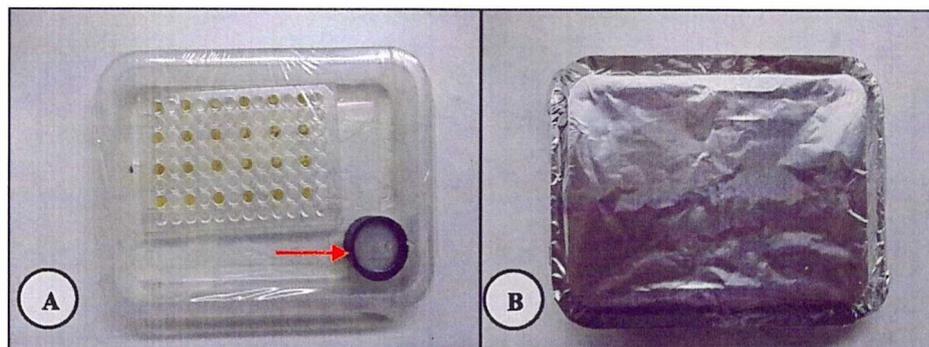


Figura 7: (A) Recipiente plástico protegido por filme de PVC, contendo a placa de Elisa com alimento e as larvas transferidas, solução saturada de água e NaCl (seta); (B) Todo conjunto foi envolto em papel laminado.

Os experimentos foram mantidos em estufa tipo BOD a 28°C e aproximadamente 70% UR (Camargo, 1972; Buschini & Campos, 1995). O desenvolvimento das larvas foi acompanhado diariamente até o nascimento do adulto na placa de Elisa.

4. Montagem e desenvolvimento de mini-colônias de *Frieseomelitta varia* utilizando-se rainhas produzidas *in vitro*

As rainhas virgens emergidas foram pesadas individualmente, em balança eletrônica de precisão Metter (AE50). Após a pesagem, foram marcadas no mesonoto com caneta *Creative Maker Compactor* atóxica e sem odor (Figura 8), para facilitar sua identificação na colônia.



Figura 8: Rainha de *Frieseomelitta varia* produzida *in vitro* após o nascimento, com marcação no mesonoto indicada pela seta.

As rainhas recém nascidas foram acondicionadas em placas de Petri de tamanho grande, com aproximadamente 10 a 15 operárias jovens (de coloração clara), solução de sacarose a 50% (50% açúcar e 50% água) e uma pequena quantidade de cerume retirada da

colônia da qual posteriormente, foram retiradas as células de cria e as operárias jovens para a montagem das novas colônias.

As placas permaneceram na estufa por alguns dias para a observação do comportamento de aceitabilidade das operárias com relação à nova rainha e, para que a rainha introduzida adquirisse o odor da nova colônia, diminuindo desta forma o risco de rejeição pelas operárias.

Após este período, a rainha juntamente com as operárias foi introduzida em uma mini-colônia (caixa de madeira 16 x 14 x 16 cm com tampa de vidro) contendo xarope (solução de sacarose 50%), pólen natural, mais 20 operárias novas e/ou nutridoras coletadas de colônias naturais e células de cria velha contendo indivíduos na fase de pupa prestes a emergir, garantindo dessa forma a manutenção e estabelecimento da nova colônia.

Em alguns casos, a fim de evitar o ataque às rainhas virgens produzidas *in vitro*, utilizamos uma gaiola de proteção para abelhas formada por uma base de madeira e uma tela de arame de pequeno diâmetro. Este teste consistia em isolar dentro da gaiola a rainha virgem produzida, um pedaço de algodão embebido em xarope e em média 3 a 5 operárias jovens.

Inicialmente, as mini-colônias foram mantidas em estufa BOD a 28° C e 70% de umidade, por sete dias em média, dependendo das condições climáticas. Após este período elas foram transferidas para o meliponário e o orifício de entrada foi desobstruído, permitindo o fluxo dos indivíduos e a saída da rainha virgem para o vôo nupcial.

As colônias foram monitoradas periodicamente, verificando a presença da rainha, a população de operárias e a disponibilidade de alimento. Quando necessário, as colônias iniciais recebiam reforços de cria e/ou operárias e alimento.

Durante os experimentos constatamos a construção de algumas celas de aprisionamento de rainhas virgens em colônias naturais de *Frieseomelitta varia*. Estas câmaras construídas com cerume foram retiradas das colônias, juntamente com as rainhas virgens aprisionadas, com a ajuda de uma espátula. As rainhas foram acondicionadas em placas de Petri e levadas ao laboratório onde foram expostas rapidamente a baixas temperaturas em gelo (4°C), apenas o suficiente para que adormecessem (+/- 1 minuto), pesadas e marcadas no mesonoto com tinta atóxica. Passado algum tempo, quando as rainhas despertaram por completo, foram devolvidas à colônia de origem.

5. Ocorrência de machos em colônias naturais de *Frieseomelitta varia*

Para verificar a(s) época(s) de produção de machos de *Frieseomelitta varia*, foram utilizadas três colônias (colônia 1, 2 e 3) priorizando-se o tamanho populacional (número grande de operárias) e disponibilidade de alimento estocado. Estas colônias foram utilizadas apenas para esse propósito.

Os dados foram coletados durante um ano, a partir de setembro/2007 até agosto/2008. Para registrar a proporção do sexo dos membros da colônia, foram coletadas mensalmente de cada colônia, células de cria contendo indivíduos em estágio pupal. O número de células de cria foi coletado de acordo com as condições e disponibilidade da colônia. Estas células foram colocadas em placas de Petri contendo a identificação do ninho de origem e, levadas ao laboratório onde foram desoperculadas com o auxílio de uma pinça de ponta fina.

As pupas retiradas das células, depois de verificado o sexo, foram colocadas em placas de Petri identificadas com o número da colônia de origem e mantidas em estufa à 28° C para completarem seu desenvolvimento. Depois de nascidas, as abelhas foram devolvidas aos seus respectivos ninhos para que a sua ausência não interferisse na dinâmica da colônia.

Foram coletados 1784 indivíduos, para a identificação do sexo com o auxílio de um estereoscópio (Leica Wild M3B), através da presença (macho) ou ausência (fêmea) do gonóstilo que caracteriza o aparelho reprodutor masculino. Desta forma a razão sexual, a frequência de machos e fêmeas, de cada colônia foi registrada mensalmente.

Para a análise dos dados coletados, computamos o número total de indivíduos de ambos os sexos em cada colônia e estabelecemos uma frequência mensal. Para a análise de múltiplas amostras independentes utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* (ANOVA) considerando significativos os valores de probabilidade menores que 5% ($p < 0,05$). O programa *Statistic 6.0* foi utilizado para realizar tais testes estatísticos.

IV- RESULTADOS

1. Quantificação do volume de alimento larval em células de cria de *Frieseomelitta varia*

Observamos uma variação no volume médio de alimento larval em células de operárias/machos entre os meses de coleta (Tabela I).

Tabela I: Volumes médios de alimento larval coletado em relação ao número de células analisadas em *Frieseomelitta varia*.

Volume de alimento larval (μl) em células de operária de <i>Frieseomelitta varia</i>			
Meses de Coleta	Nº células	Volume de alimento larval (μl)	
		Total	Média por célula
maio	112	2713	24,22
junho	92	2564	27,87
agosto	63	2024	32,13
novembro	76	2202	28,97
fevereiro	115	2751	23,92
abril	64	1476	23,06
Total	522	13730	26,70 \pm 3,55 μl

Esta variação no volume médio de alimento larval ocorreu porque a quantidade de alimento depositada nos alvéolos pelas operárias também variou, conforme apresentado na figura 9. O volume do alimento nas células de cria de operárias/machos, variou entre 20 e 38 μl .

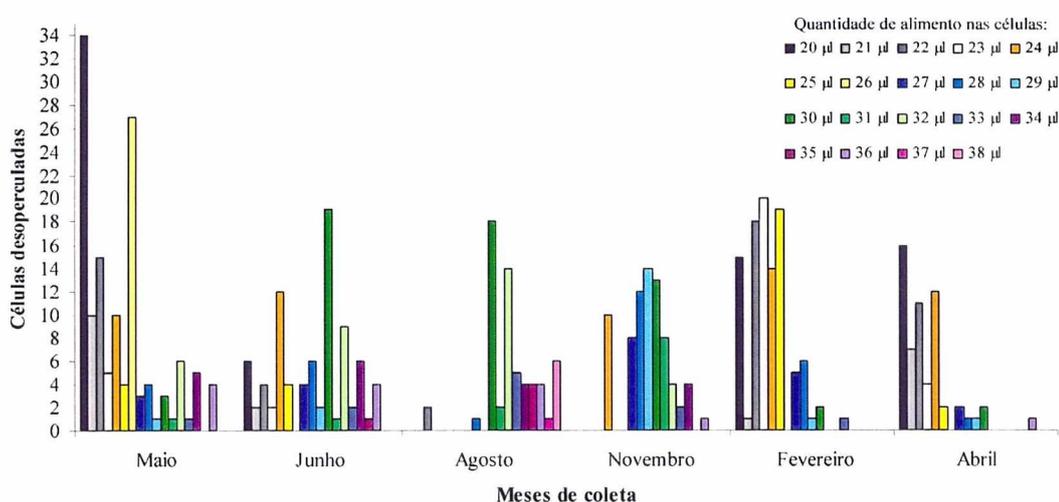


Figura 9: Variação do volume de alimento larval em células de cria de *Frieseomelitta varia*, durante os meses de coleta.

Verificamos ainda que o volume de alimento oferecido às larvas variou dependendo da época (seca ou chuvosa) em que os dados foram coletados (Figura 10).

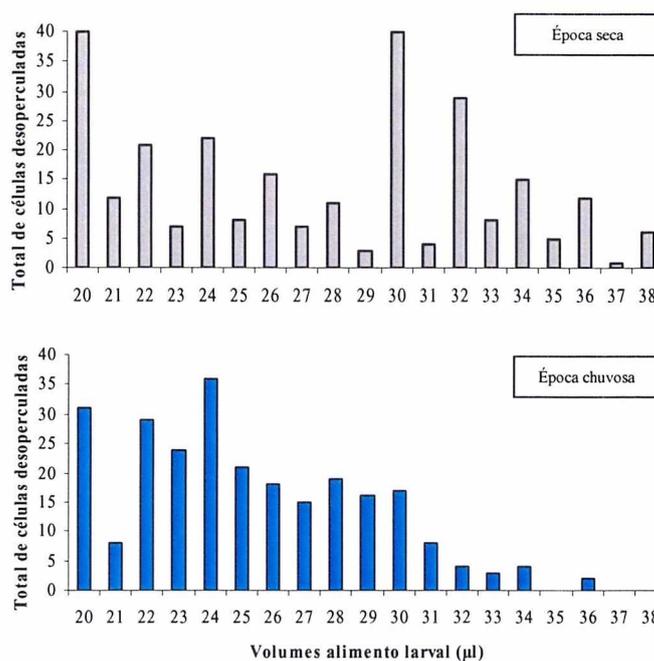


Figura 10: Variação do volume total de alimento larval nos alvéolos de *Frieseomelitta varia* nas diferentes épocas de coleta dos dados (época seca/chuvosa).

Na época seca (maio, junho e agosto), a quantidade de alimento nas células de operária variou consideravelmente, encontramos células com o volume mínimo de 20 µl até o volume máximo de 38 µl, apesar de estas últimas aparecerem em menor número. Por outro lado, na época chuvosa (novembro, fevereiro e abril), a quantidade de alimento concentrou-se entre 20 e 30 µl, havendo uma baixa frequência de células analisadas com volume superior a 32 µl.

Analisando o número total de células desoperculadas e o volume total de alimento coletado nos meses de maio, junho, agosto (Estação Seca) e novembro, fevereiro e abril (Estação Chuvosa) (Tabela II), encontramos que o volume total médio de alimento larval existente em uma célula de operária/macho de *F. varia* na estação seca e na estação chuvosa, foram de $27,34 \pm 5,32$ µl e $25,21 \pm 3,68$ µl, respectivamente.

Tabela II: Volumes médios de alimento larval em células de cria de *Frieseomelitta varia* em diferentes estações do ano e comparação das médias pelo teste Z.

	Estações do ano	
	Seca	Chuvosa
Tamanho amostral	267	255
Volume médio de alimento (μ l)	27.34	25.21
Variância paramétrica	28.40	13.60
Desvio Padrão	5.32	3.68
(Z)=	5.3370	---
(p)unilateral =	< 0.0001	---
Poder (0.05)	0.9999	---
Diferença entre as médias =	2.1328	---
IC 95% (Dif. entre Médias) =	2.129797	2.135812

Comparando as médias das duas estações (seca e chuvosa), por meio do teste Z, encontramos que $\alpha = 0,0001$, indicando que existe variação entre a média de alimento larval nas células de operárias/machos, nos períodos seco e chuvoso.

Com base no intervalo de confiança entre as médias das amostras ($\pm 2,13$), podemos dizer que o volume de alimento larval em uma célula de cria de *F. varia* encontra-se, com grau de confiança de 95%, entre 24,57 μ l (limite inferior) e 28,83 μ l (limite superior).

2. Determinação do número de instares larvais em *Frieseomelitta varia*

Através da análise da curva de distribuição de freqüências da largura da cápsula cefálica (Figura 11) observamos a presença de cinco picos, sendo os três primeiros bem distintos e os dois últimos bastante próximos. Os declives da curva de distribuição sugerem a ocorrência de no mínimo quatro e, no máximo, cinco instares larvais.

Neste sentido, foram testadas duas hipóteses a fim de determinar o número de instares larvais para a espécie *Frieseomelitta varia*: 1) a existência de quatro instares larvais; 2) a existência de cinco instares, por meio do modelo de Dyar, obtendo-se os dados apresentados na Tabela III.



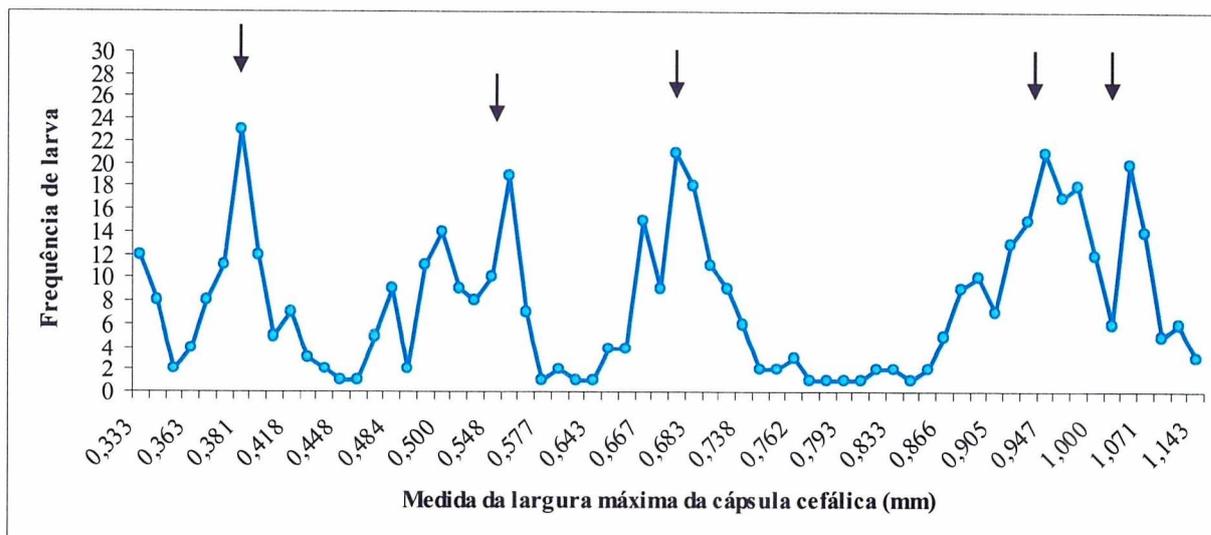


Figura 11: Curva de distribuição de frequência da largura das cápsulas cefálicas (mm) de larvas de *Frieseomelitta varia* (n=494).

Tabela III: Número de ínstaes larvais em *Frieseomelitta varia*, amplitude, média da largura da cápsula cefálica (mm) e intervalo de confiança (IC).

Instar	Hipóteses					
	4 ínstaes			5 ínstaes		
	Amplitude	Média	IC (P<0,05)	Amplitude	Média	IC (P<0,05)
I	0,333 - 0,429	0,380	0,375 - 0,385	0,333 - 0,452	0,395	0,389 - 0,401
II	0,476 - 0,577	0,523	0,517 - 0,529	0,476 - 0,577	0,523	0,517 - 0,529
III	0,650 - 0,762	0,701	0,696 - 0,706	0,650 - 0,762	0,701	0,696 - 0,706
IV	0,866 - 1,143	0,985	0,971 - 0,999	0,829 - 0,976	0,894	0,887 - 0,901
V				1,000 - 1,043	1,083	1,082 - 1,083
$R^2 =$	0,98			0,25		
$K =$	1,37			1,72		

K = razão de crescimento, calculado a partir das médias obtidas na curva de distribuição de frequência. R^2 = coeficiente de determinação.

Considerando a hipótese do número de ínstaes igual a quatro, obteve-se uma estimativa da taxa de crescimento $K=1,37$ e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,98. Por outro lado, considerando a presença de cinco ínstaes larvais, obteve-se $K=1,72$ e coeficiente de determinação igual a 0,25.

Os resultados da hipótese de existência de quatro ínstaes resultou em maior coeficiente de determinação ($R^2= 0,98$) em relação à outra hipótese estipulada ($R^2=0,25$), demonstrando que, os intervalos de medidas das cápsulas cefálicas formulados para este modelo apresentaram alta qualidade no ajuste, portanto a primeira hipótese é aceita como a mais adequada para caracterizar a população de *F. varia* amostrada.

3. Produção *in vitro* de rainhas de *Frieseomelitta varia*

Sabendo que nas abelhas desta espécie a diferenciação das castas ocorre por meio da quantidade de alimento ingerido pela larva, sendo que os indivíduos diferenciados em rainha ingerem uma quantidade maior de alimento do que aquelas que originam operárias e, tendo encontrado um volume médio de alimento larval de $26,70 \pm 3,55 \mu\text{l}$ por célula de operária, tomamos como base este dado para dar início aos testes de manipulação de diferentes quantidades de alimento oferecidas às larvas.

Os experimentos foram realizados a partir da transferência de larvas na fase pré-defecante com cápsula cefálica medindo entre 0,866 e 1,143 mm.

Foram realizados nove experimentos de transferência de larvas de *Frieseomelitta varia*, nos meses de fevereiro, abril, maio, junho, julho, agosto, outubro, novembro e dezembro, totalizando 339 larvas transferidas e destas, 109 indivíduos (32%) completaram seu desenvolvimento até a fase adulta (Tabela IV).

Tabela IV: Desenvolvimento *in vitro* das larvas de *Frieseomelitta varia*.

Meses de Transferência	Número de larvas transferidas	Natalidade		Mortalidade	
		Quant.	%	Quant.	%
abril	48	16	33	32	67
julho	35	23	66	12	34
outubro	38	5	13	33	87
dezembro	65	9	14	56	86
fevereiro	25	5	20	20	80
maio	36	5	14	31	86
junho	18	15	83	3	17
agosto*	32	0	0	32	100
novembro**	42	31	74	11	26
Total	339	109	32	230	68

* Mortalidade total das larvas transferidas

** Nascimento de machos

No experimento realizado durante o mês de novembro (n=42 larvas transferidas), após o nascimento dos adultos, os indivíduos foram analisados sob lente de aumento (40x) e verificamos que todas as abelhas deste grupo (n=31 indivíduos emergidos) pertenciam ao sexo masculino. Fato este que despertou nosso interesse a respeito das possíveis épocas de produção de machos para as abelhas desta espécie. Estes dados serão apresentados adiante.

Sabendo que a quantidade média de alimento em uma célula de cria de *F. varia* é de aproximadamente $26,7 \mu\text{l}$ e, supondo que a célula auxiliar contenha o mesmo volume de

alimento, procedemos os experimentos com diferentes volumes de alimento a partir do volume conhecido (ver item 1), fornecendo às larvas 25, 30, 35, 40 e 50 μl (Tabela V).

Tabela V: Diferentes quantidades de alimento larval oferecidos às larvas para produção de rainhas *in vitro* de *Frieseomelitta varia*.

Meses referentes às transferências	Vol. de alimento larval (μl)	Larvas Transferidas	Natalidade		Rainhas Emergidas		Operárias Emergidas	
			Número	%	Número	%	Número	%
junho	25	18	15	83	6	40	9	60
dezembro/fevereiro	30	90	14	16	11	79	3	21
maio/outubro	35	74	10	14	10	100	0	0
abril/julho	40	83	39	47	29	74	10	26
agosto	50	32	0	0	0	0	0	0
Total		297	78		56		22	

A partir dos dados sumarizados na tabela acima, podemos observar que no experimento realizado em agosto (50 μl de alimento larval), houve mortalidade total das larvas transferidas (n=32). Por sua vez, nos experimentos em que foram fornecidas às larvas quantidades menores de alimento, 30 e 40 μl (dezembro/fevereiro e abril/julho), houve uma maior frequência de larvas diferenciadas em rainha. Os experimentos realizados nos meses de maio e outubro nos quais foi oferecido às larvas em desenvolvimento um volume de alimento larval de 35 μl , apesar da taxa de mortalidade das larvas ter sido elevada, todas as larvas nascidas (n=10) se diferenciaram em rainha.

3.1 Possível ocorrência de intercasta

No experimento realizado em dezembro (30 μl), nasceram nove indivíduos (Tabela IV), entre eles seis rainhas e três operárias, curiosamente verificamos o nascimento de um indivíduo com algumas características peculiares que, em princípio pensamos ser uma rainha, pois apresentava o abdômen mais desenvolvido do que de uma operária e com coloração mais clara, como o de uma rainha (Fig.12B). Entretanto, ao observar este indivíduo sob lente de aumento do estereomicroscópio, observamos a presença da corbícula no último par de pernas, semelhante à corbícula de uma operária (Fig. 12A) embora fosse menos aparente (Fig. 12C).

Esta abelha recebeu o mesmo tratamento dado às rainhas produzidas, a fim de observarmos o seu comportamento junto às operárias e sua viabilidade reprodutiva.

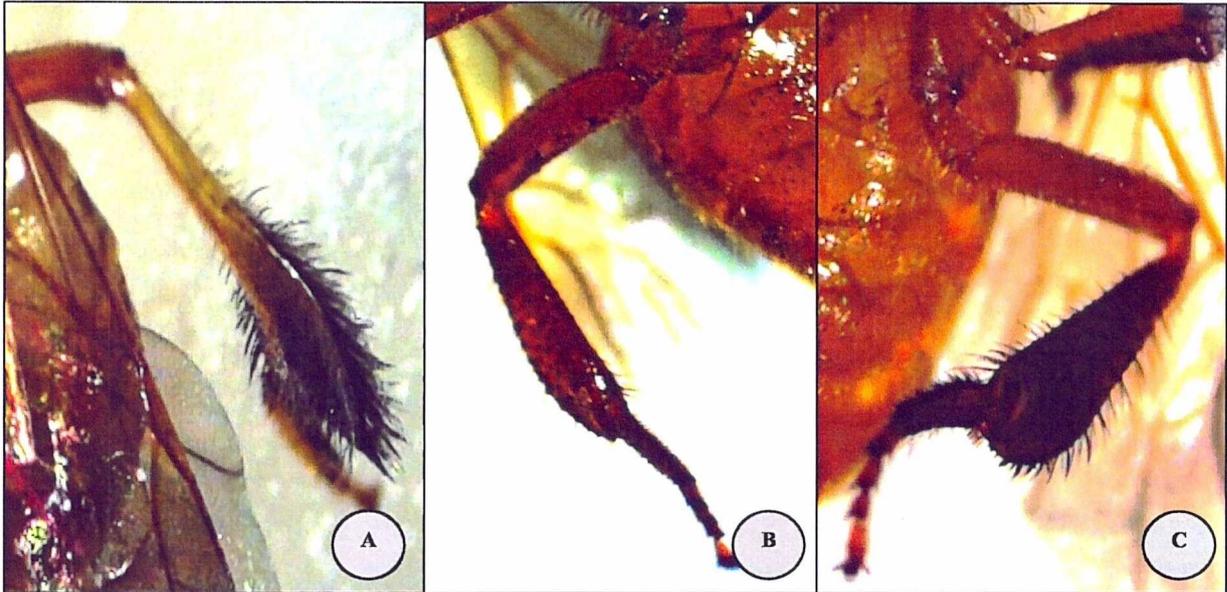


Figura 12: Detalhe do último par de pernas dos adultos nascidos do experimento realizado em dezembro (30 μ l de alimento larval). A: Operária, B: Rainha, C: indivíduo com características intermediárias entre rainha e operária.

Ao introduzir a abelha marcada na mini-colônia, observamos que: ao perceber a presença das operárias, sua primeira reação foi procurar refúgio atrás dos potes de pólen localizados em um dos cantos da mini-colônia e ali ficou por aproximadamente 12 minutos; quando saiu do esconderijo caminhou rapidamente para a tampa de vidro da colônia e ali ficou passando constantemente as pernas posteriores sobre o abdômen. Após terem notado a presença da nova rainha, três jovens operárias nutridoras permaneceram ao seu redor, por vezes tocando-a com as antenas.

Durante o tempo de observação (3h e 20 minutos) não observamos comportamento agressivo das operárias, entretanto a possível “intercasta” se apresentava agitada à aproximação das operárias.

No terceiro dia após ter sido introduzida, encontramos a “intercasta” morta no depósito de lixo da colônia.

4. Mini-colônias de *Frieseomelitta varia* utilizando-se rainhas produzidas *in vitro*

As rainhas produzidas sob condições controladas, logo após o nascimento, foram pesadas e marcadas na região torácica (mesonoto) e transferidas para placas de Petri com alimento (xarope) e algumas operárias jovens, para posteriormente serem introduzidas nas mini-colônias. Dentre as rainhas produzidas (n=56), quatro fêmeas morreram quando ainda

estavam na placa e não apresentaram indícios de morte por agressão. No total, foram introduzidas 52 rainhas virgens produzidas em 52 mini-colônias (Tabela VI).

Verificamos uma alta taxa de mortalidade das rainhas introduzidas (82%) nas mini-colônias (Tabela VI). Os fatores responsáveis pela morte das rainhas virgens produzidas podem ser observados na figura 13.

Tabela VI: Rainhas de *Frieseomelitta varia* produzidas *in vitro*, introduzidas e aceitas nas mini-colônias.

Mês referente à Transferência	Rainhas produzidas	Rainhas introduzidas	Rainhas fecundadas		Mortalidade dos adultos	
			Quant.	%	Quant.	%
abril	12	10	0	0	10	100
julho	17	16	1	6	15	88
outubro	5	5	1	20	4	80
dezembro	7	6	0	0	6	86
fevereiro	4	4	2	50	2	50
maio	5	5	1	20	4	80
junho	6	6	1	17	5	83
Total	56	52	6	11	46	82

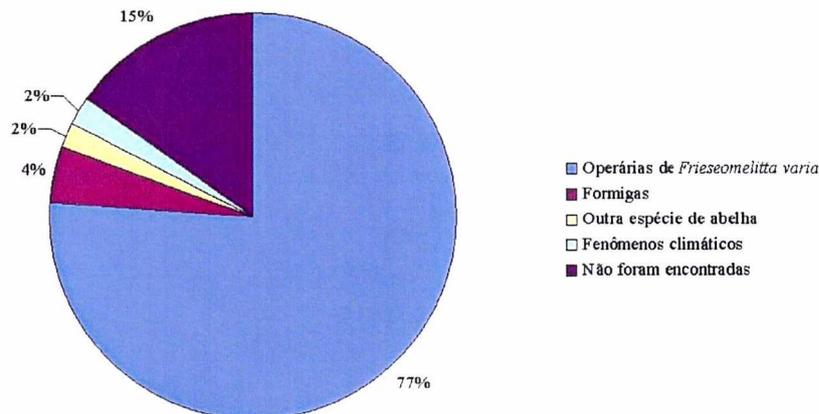


Figura 13: Fatores responsáveis pela alta mortalidade das rainhas de *Frieseomelitta varia* produzidas *in vitro*.

Quanto às interações entre as rainhas produzidas e as operárias nas mini-colônias, verificamos que algumas operárias apresentaram comportamento agressivo resultando em 77% dos casos, na eliminação das rainhas virgens. Em todos os testes de introdução das rainhas, o tempo de rejeição e conseqüentemente morte das rainhas produzidas não ultrapassou 48 horas.

Em alguns casos (15%) as rainhas introduzidas não foram encontradas no interior das novas colônias.

Em virtude da agressividade das operárias, testamos a utilização de gaiolas de proteção para isolar as rainhas produzidas *in vitro* (n=8) das operárias da mini-colônia. Em

75% dos casos (n=6), em dois dias (± 48 horas) após a introdução das gaiolas de proteção nas mini-colônias, as operárias cobriram completamente a tela das gaiolas com cerume (Figura 14) ocasionando a morte das rainhas. Este comportamento se repetiu nas duas mini-colônias restantes em um período um pouco mais longo de 3 dias (± 72 horas).

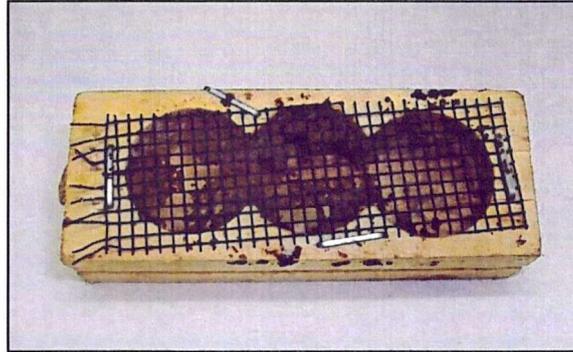


Figura 14: Gaiola dentro da qual as rainhas produzidas foram mantidas isoladas das operárias da mini-colônia. Detalhe da tela com fragmentos de cerume que a cobriam.

O estabelecimento da fisogastria pelas rainhas produzidas *in vitro* foi observado em seis casos. Depois de passar pela aceitação das operárias, as rainhas produzidas nos experimentos de julho, outubro, fevereiro, maio e junho (Tabela VI), realizaram o vôo nupcial com sucesso. Embora não tenhamos observado diretamente este comportamento, verificamos a construção, o aprisionamento e a oviposição de células de cria pela rainha, além disso, observarmos a presença das rainhas marcadas com o abdômen dilatado, fisogástrico, nas mini-colônias (Figuras 15A e 15B).

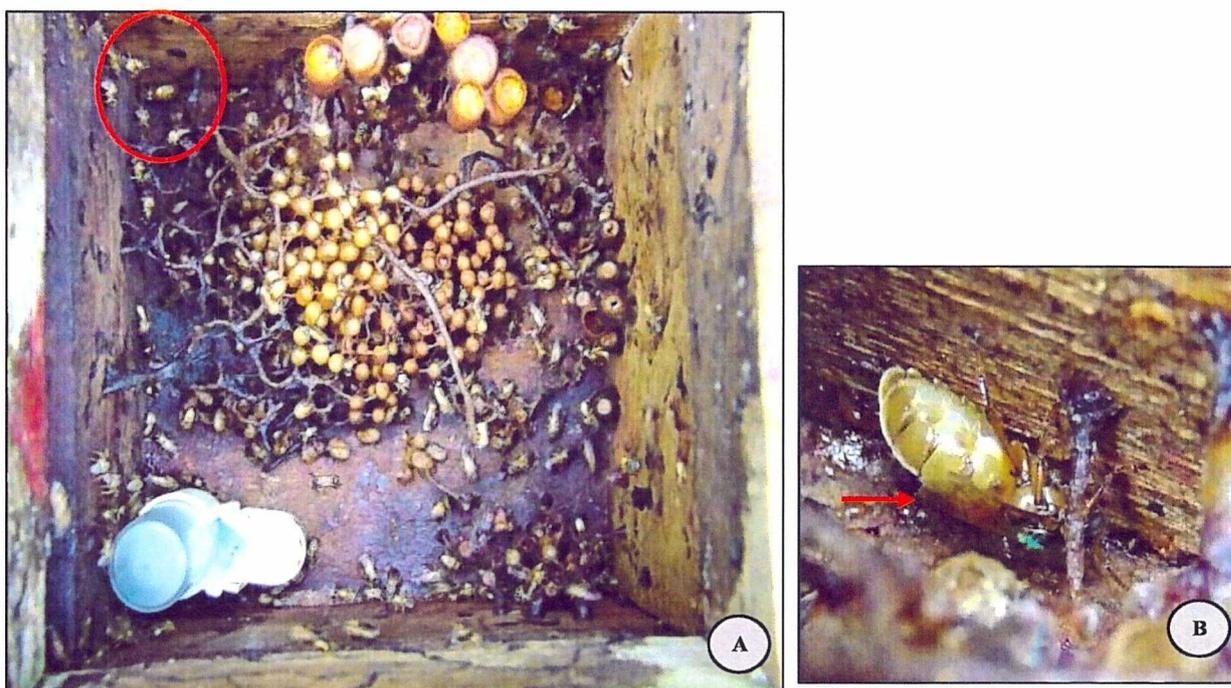


Figura 15: A) Mini-colônia com rainha produzida “*in vitro*” (círculo), B) detalhe da rainha marcada e fecundada. A seta evidencia o abdômen desenvolvido da rainha marcada.

Durante as visitas de monitoramento dos ninhos no meliponário, observamos o aparecimento de três rainhas virgens naturais aprisionadas em câmaras de cerume. A primeira rainha foi encontrada em abril/2007 (Figura 16) presa em uma câmara de cerume construída pelas operárias (1,8 cm de diâmetro e 2 cm de espessura da parede) na parede lateral de vidro de uma colônia experimental, montada a partir de módulos de madeira e com parede externa de vidro (Figura 17), elaborada por Jairo de Souza e Ademilson Espencer Egea Soares do Departamento Genética da FMRP/USP com a finalidade de facilitar as observações diretas da colônia. Acompanhamos esta rainha virgem por 10 dias, até verificarmos no décimo dia a destruição da cela de aprisionamento e a antiga rainha fisogástrica caminhando pela colônia.



Figura 16: Célula de aprisionamento com rainha virgem de *Frieseomelitta varia*. Foto: Weyder Santana



Figura 17: Colônia experimental para *Frieseomelitta varia*, construída em módulos de madeira e laterais de vidro. A) Vista lateral; B) Vista frontal; C) Vista interna da colônia, D) Detalhe interno dos módulos preenchidos. Fotos: Weyder Santana e Geusa Simone de Freitas.

Nos outros dois casos, encontramos as rainhas virgens aprisionadas nas câmaras de cerume construídas na tampa de duas colônias racionais tradicionais, nos meses de maio/2007 e setembro/2008. A rainha encontrada no mês de maio/2007 ($p=0,0223$ g) foi eliminada pelas operárias em menos de 24 horas após ter sido devolvida à colônia, seu corpo estava totalmente coberto com cerume e grudado em uma das paredes do ninho.

No dia seguinte à reintrodução da rainha encontrada em setembro/2008 ($p=0,0241$ g), observamos que ela foi novamente aprisionada pelas operárias. Nove dias depois, a câmara de aprisionamento estava destruída e o corpo da rainha virgem marcada foi encontrado na área reservada para depósito de lixo da colônia, estava apenas com uma das pernas anteriores.

Em meados de outubro/2007, notamos a presença de dois casulos reais em uma colônia de *Frieseomelitta varia*. A colônia se encontrava muito populosa, com muitas células de cria, estoque de mel e pólen e a rainha mãe foi vista caminhando agilmente pelos favos. Em setembro/2008, outro casulo real foi encontrado em outra colônia localizada no meliponário, entretanto, não foi observada a presença da rainha dominante nesta colônia.

Os três casulos reais foram retirados cuidadosamente de suas respectivas colônias e mantidos em estufa a 28 °C, dentro de pequenas placas de Petri até o seu nascimento, quando foram pesadas, marcadas e devolvidas às colônias. Com exceção de uma rainha que morreu acidentalmente durante o procedimento de pesagem.

O peso destes indivíduos produzidos em condições naturais foi comparado com o peso das rainhas produzidas artificialmente que obtiveram sucesso ao se fixarem como fêmea dominante nas mini-colônias (Tabela VII) e com o restante das rainhas nascidas (Tabela VIII).

Tabela VII: Peso (g) das rainhas produzidas em condições naturais e das rainhas produzidas em laboratório que se estabeleceram nas mini-colônias.

Peso das rainhas virgens após o nascimento (g)			
Rainhas naturais		Rainhas <i>in vitro</i>	
Encontrada em:	Peso	Peso	Produzida em:
maio	0,0223	0,0218	fevereiro
setembro	0,0241	0,0168	fevereiro
setembro	0,0198	0,0209	maio
outubro	0,0219	0,0181	junho
outubo	0,0269	0,0199	julho
		0,0149	outubro
Média	0,0230	0,0187	

Segundo o Teste-t para duas amostras independentes (Tabela VIII) as rainhas produzidas “*in vitro*” (P) e as rainhas produzidas naturalmente nas colônias (N) não possuem pesos médios diferentes estatisticamente entre si, uma vez que o valor-p foi menor que 0,05 (0,0128), adotando nível de significância de 5%.

Tabela VIII: Teste-t: Comparação do peso ao nascer entre as rainhas naturais (N) e rainhas produzidas em condições controladas (P) que se estabeleceram como fêmeas dominantes nas mini-colônias.

	N	P
Média =	230.00	187.33
Variância =	709.00	685.86
Variância =	696.14	---
T =	2.67	---
Graus de liberdade =	9	---
p (unilateral) =	0.0128	---
Poder (0.05)	0.8469	---
Diferença entre as médias =	42.66	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	6.52 a 78.80	---

Por sua vez, os dados de peso médio das rainhas produzidas *in vitro* que morreram (Pm) comparado com os dados coletados das rainhas virgens naturais (N), sumarizados na Tabela IX, demonstraram que a média do peso das duas amostras também não são diferentes entre si, pois o valor-p encontrado é menor que 0,05 ($p=0,0023$).

Tabela IX: Teste-t: Comparação do peso ao nascer entre as rainhas naturais (N) e rainhas produzidas *in vitro* que morreram (Pm).

	N	Pm
Tamanho =	5	50
Média =	230	178
Variância =	709	1485
Variância =	1426.04	---
T =	2.96	---
Graus de liberdade =	53	---
p (unilateral) =	0.0023	---
Poder (0.05)	0.9583	---
Diferença entre as médias =	52.44	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	16.93 a 87.94	---

5. Ocorrência de machos em colônias naturais de *Frieseomelitta varia*

A ocorrência de todos os indivíduos (machos e fêmeas) durante os meses de coleta estão representados na Tabela X e Figura 18.

Tabela X: Frequência de machos e operárias em três colônias naturais de *Frieseomelitta varia* em diferentes épocas do ano.

Colônia	Frequência (N° e %) células com pupas de machos e operárias				Total de células n=
	Machos		Operárias		
	Quant.	Freq.(%)	Quant.	Freq.(%)	
Setembro					
Colônia 1	0	0	34	100	34

Colônia 2	2	6	30	94	32
Colônia 3	3	6	48	94	51
Outubro					
Colônia 1	1	2	40	98	41
Colônia 2	3	7	43	93	46
Colônia 3	2	4	43	96	45
Novembro					
Colônia 1	21	30	50	70	71
Colônia 2	18	27	49	73	67
Colônia 3	15	32	32	68	47
Dezembro					
Colônia 1	28	48	30	52	58
Colônia 2	37	59	26	41	63
Colônia 3	20	28	51	72	71
Janeiro					
Colônia 1	33	53	29	47	62
Colônia 2	29	38	48	62	77
Colônia 3	30	47	34	53	64
Fevereiro					
Colônia 1	19	44	24	56	43
Colônia 2	15	36	27	64	42
Colônia 3	17	28	43	72	60
Março					
Colônia 1	8	16	42	84	50
Colônia 2	6	13	40	87	46
Colônia 3	9	22	32	78	41
Abril					
Colônia 1	6	10	53	90	59
Colônia 2	9	19	38	81	66
Colônia 3	11	17	52	83	80
Maio					
Colônia 1	8	21	30	79	38
Colônia 2	4	7	53	93	57
Colônia 3	4	10	36	90	50
Junho					
Colônia 1	10	29	24	71	63
Colônia 2	7	18	31	82	56
Colônia 3	7	15	39	85	61
Julho					
Colônia 1	13	43	17	57	73
Colônia 2	16	48	17	52	81
Colônia 3	22	44	28	56	94
Agosto					
Colônia 1	12	31	27	69	70
Colônia 2	15	35	28	65	78
Colônia 3	19	34	37	66	56
Total	479	27	1305	73	1784

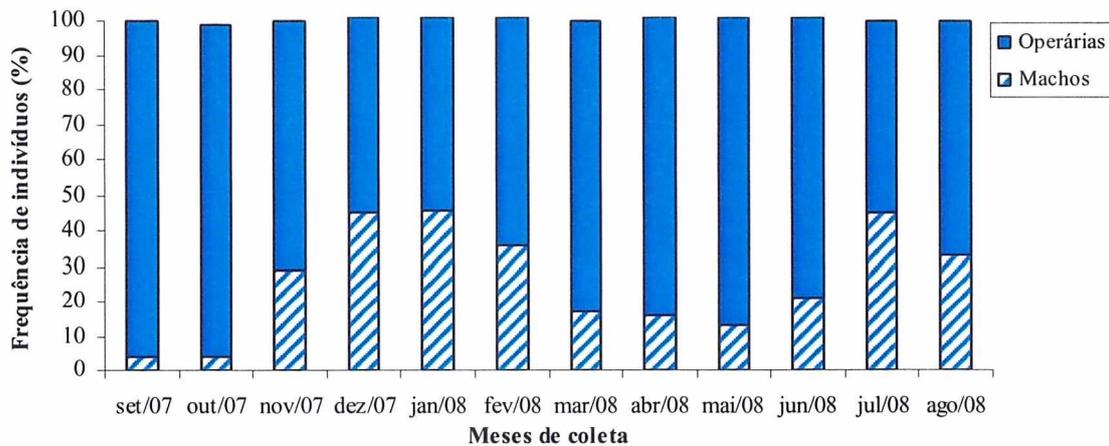


Figura 18: Frequência relativa (%) de machos e operárias de *Frieseomelitta varia* coletados em 1784 células de cria em três colônias distintas ao longo de 12 meses.

Os dados coletados mostraram que a produção de machos nas colônias, embora ocorra constantemente durante o ano, ocorre com maior ou menor intensidade em determinadas épocas (Figura 18). Nos meses de outubro e setembro, por exemplo, a taxa de indivíduos produzidos pertencentes ao sexo masculino é baixa (4%) quando comparado à sua produção nos outros meses. A porcentagem média de células com machos em estágio pupal variou de 4% (n=5) em setembro até 46% (n=92) em janeiro.

Os resultados da frequência total de machos nas colônias estudadas indicaram um decréscimo gradual na produção de machos a partir de março, seguido por um aumento no mês de julho e agosto. A ocorrência de machos decresce novamente em setembro e a partir do mês de novembro, ocorre um aumento na sua produção que se estende até o mês de fevereiro.

Os dados médios da frequência de machos produzidos ao longo do ano (12 meses) foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) considerando nível de significância inferior a $\alpha=0,05$, encontramos que $p=0,000014$, indicando que existe diferença significativa na frequência de machos produzidos entre os meses aqui estudados.

Por sua vez, a produção de machos nas três colônias de *Frieseomelitta varia* foram analisadas individualmente e as frequências de machos e operárias em cada colônia podem ser observadas na Figura 19.

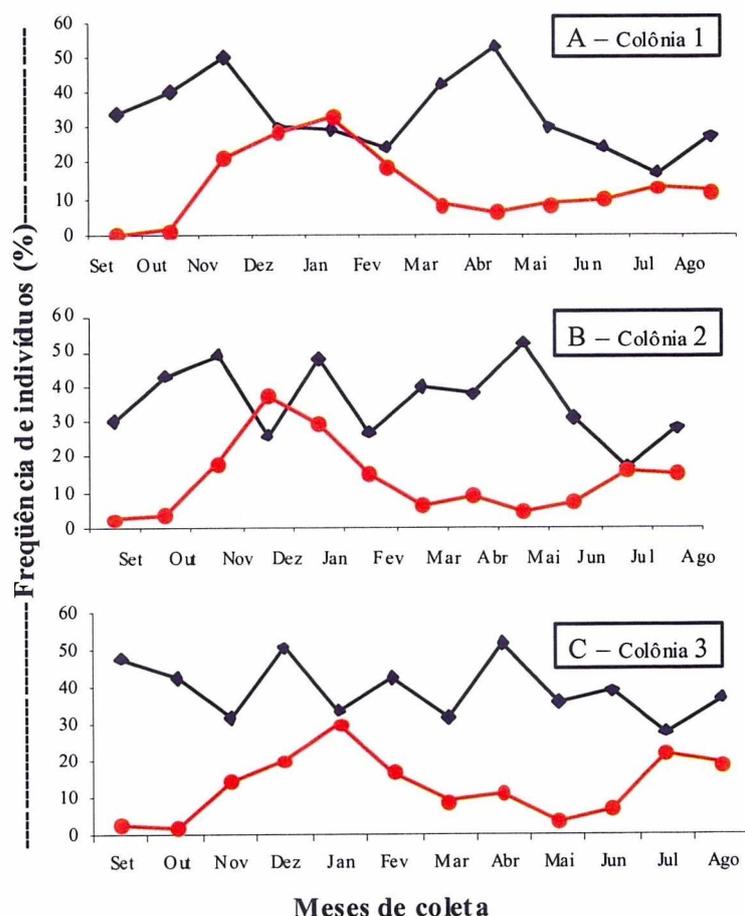


Figura 19: Frequência relativa (%) de machos (VERMELHO) e operárias (PRETO) por mês de amostragem em cada uma das três colônias de *Frieseomelitta varia*. Colônia 1 (A), Colônia 2 (B) e Colônia 3 (C).

Verificamos que as colônias 2 (B) e 3 (C) produziram machos em todos os meses de observação. Não foi observada a presença de pupas de machos na colônia 1 (A) na amostragem de setembro. Os gráficos apresentados também evidenciam que nas três colônias, os meses de novembro, dezembro, janeiro e fevereiro foram aqueles os quais ocorreu a maior frequência de machos durante o ano.

V- DISCUSSÃO

1. Quantificação do volume de alimento larval em células de cria de *Frieseomelitta varia*

As abelhas sem ferrão seguem a estratégia de provisionamento massal de alimento em suas células de cria (Kerr, 1948; Michener, 1974; Nogueira-Neto, 1997), entretanto, o mecanismo de determinação das castas difere entre as abelhas do gênero *Melipona* e as abelhas dos demais gêneros. Nos meliponíneos, exceto os do gênero *Melipona*, a indução da casta parece ser determinada apenas pela quantidade de alimento ingerido pela larva durante seu desenvolvimento (Hartfelder *et al*, 2006). Camargo (1972) demonstrou em prática esta teoria, produzindo rainhas de *Scaptotrigona postica* a partir de quantidades excessivas de alimento larval.

O passo inicial para a realização dos experimentos a cerca da teoria de determinação das castas com base na quantidade de alimento fornecido à larva, é a quantificação do alimento larval nas células de operária. Neste trabalho encontramos para *Frieseomelitta varia*, um volume total médio de alimento larval em célula de operária igual a $26,7 \pm 3,55 \mu\text{l}$.

As operárias de *F. varia* participam ativamente do estágio de provisionamento das células depositando alimento em seu interior, em média 2,0 a 4,0 vezes (Faustino, 2002) até completar a quantidade suficiente de alimento necessária para o desenvolvimento da larva. Verificamos a ocorrência de uma variação do volume de alimento larval contido nas células de cria entre os meses de coleta: estação seca (maio, junho e agosto) de $20 \mu\text{l}$ à $38 \mu\text{l}$; estação chuvosa (novembro, fevereiro e abril) a maior frequência de células ocorreu com quantidades de alimento larval entre 20 e $30 \mu\text{l}$.

A variação na quantidade de alimento provisionado nas células de cria está relacionada à disponibilidade de alimento estocado e/ou à densidade populacional da colônia, uma vez que as abelhas coletam quantidades maiores ou menores de recursos alimentares (néctar e pólen) de acordo com a sua disponibilidade na natureza e os fornecem às larvas da mesma forma. Nas épocas chuvosas do ano, por exemplo, embora tenha mais recursos disponíveis, o investimento na produção de cria nas colônias também aumenta, conseqüentemente, a demanda de alimento aumentaria e as operárias por sua vez investiriam menos na alimentação das larvas, depositando menores quantidades de alimento por célula para atender as necessidades da colônia.

Entretanto, não podemos afirmar com base nos dados apresentados que a situação descrita acima ocorra desta forma, para isso é necessário verificar futuramente o efeito do estoque de alimento e da densidade populacional sobre a quantidade de alimento fornecida às larvas.

2. Determinação do número de instares larvais em *Frieseomelitta varia*

O processo de muda é de alto custo energético para o inseto e o conteúdo calórico e nutricional de uma cutícula mudada pode representar mais de 20% da produção total de biomassa larval (Parra, 1991). Assim, o inseto alcança um peso máximo em cada instar e perde peso durante a muda, pois a cutícula mudada e a energia usada na ecdise contribuem para perdas que chegam a ser da ordem de 45% (Waldbauer, 1962). A cutícula totalmente esclerotizada não expande, portanto, o crescimento de partes duras somente ocorre quando houver uma *muda*, quando então uma nova cutícula será produzida e expandida (Parra & Haddad, 1989). Deste modo, a avaliação das medidas das cápsulas cefálicas é um bom parâmetro para se avaliar o crescimento dos insetos, como previsto pelo modelo de DYAR.

O número de estágios larvais parece não ser constante nas abelhas. Para as espécies de abelha da subtribo Meliponina, por exemplo, tem sido verificada a presença de três a cinco instares larvais. Darchen & Delage-Darchen (1974) e Tambasco (1975), citado por Rossini (1989), encontraram cinco instares larvais para *Melipona bicolor*, *Melipona beecheii* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*, respectivamente. Entretanto, Rossini e Bueno (1986) e Rossini (1989) demonstraram através de observações diretas do desenvolvimento larval e pela análise da cápsula cefálica das larvas, a existência de três instares para *Melipona fasciculata* ($K=1,42$) e para *Melipona quadrifasciata anthidioides* ($K=1,33$).

Inicialmente, para as abelhas da espécie *Scaptotrigona postica*, Oliveira (1960) encontrou cinco instares larvais, posteriormente Neves e Cruz-Landim (1984) caracterizaram o desenvolvimento larval dessa espécie pela presença de quatro instares, separados por três mudas e uma taxa de crescimento (K) de 1,38. Azevedo (1997) encontrou dificuldades em confirmar a presença de quatro ou cinco instares em *Partamona helleri*, levando-se em conta somente o modelo de Dyar. É possível que os diferentes resultados encontrados pelos autores e as dificuldades em estabelecer precisamente o número de instares larvais, ocorram devido às diferentes metodologias empregadas pelos pesquisadores, além disso, deve-se levar em conta que as taxas de crescimento de um estágio para o outro pode ser alterado por vários fatores, como as condições de temperatura e umidade dentro da colônia, quantidade e/ou qualidade do alimento fornecido à larva.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que o coeficiente de determinação ($R=0,98$), considerando-se a hipótese de quatro instares representou melhor ajuste dos dados, como preconizado por Parra e Haddad (1989).

Quanto à razão de crescimento (K), foram observados valores médios que obedecem a uma progressão geométrica, como postulado por Dyar (1890). Considerando a presença de quatro ínstaes, a média da razão de crescimento igual a 1,37 se encontra dentro do intervalo de variação preconizado pelo modelo de Dyar, que postula que as peças do exoesqueleto dos insetos crescem de maneira mais ou menos constante a cada muda, por uma razão geométrica próxima a 1,4 vezes, e aproximou-se da razão média de 1,52 registrada por Cole (1980) para insetos holometábolos.

De acordo com os resultados encontrados, pode-se inferir que as larvas de *Frieseomelitta varia* amostradas, apresentam quatro ínstaes larvais, caracterizado pelos intervalos de largura da cápsula cefálica entre 0,333 - 0,429 mm, como sendo o primeiro ínstar, 0,476 - 0,577 mm, o segundo, 0,650 - 0,762 mm, o terceiro e, 0,866 - 1,143 mm, o quarto e último ínstar larval.

3. Transferências de larvas de *Frieseomelitta varia* com diferentes quantidades de alimento, visando a produção de rainhas “*in vitro*”

A determinação das castas nos Apidae é de origem trofogênica ou trofogenética. A determinação trofogênica ocorre quando as diferenças entre as castas surgem somente devido às diferenças alimentares, ou seja, na quantidade ou na qualidade do alimento ingerido pela larva, ou ambas (Camargo, 1972; Hartfelder & Engels 1989; Buschini & Campo, 1995). E a trofogenética se restringe, até o momento, às espécies do gênero *Melipona*, e envolve fatores genéticos atuando em conjunto com fatores alimentares (Kerr *et al.*, 1966).

A produção de rainhas nos meliponíneos com determinação trófica das castas é condicionada pelas operárias, ao construírem células de cria de tamanho maior capazes de receber mais alimento. No entanto, Terada (1974) e Faustino (2002) demonstraram que nas abelhas da espécie *Frieseomelitta varia* não ocorre construção de células reais típicas diferente das células de operária e macho. Colônias mantidas sob condições de orfandade são capazes de produzir rainhas, construindo células auxiliares próximas às células que contém larvas de operárias no fim do estágio larval, que ainda estejam se alimentando. Estas células auxiliares, através de uma conexão com as células contendo larvas, fornecem um suprimento extra de alimento para as mesmas. Ao final deste período de “superalimentação”, a larva dará origem a uma rainha.

Testando o efeito nutricional na determinação das castas em *Frieseomelitta varia*, através da manipulação de doses suplementares de alimento oferecidas às larvas no último

estágio de alimentação, pudemos observar que a quantidade de alimento consumido pelas larvas foi o fator determinante na diferenciação final do adulto com características fenotípicas bem definidas. O desenvolvimento de rainhas ocorreu a partir da administração de 25 até 40 μ l de alimento larval extra. Volumes maiores de alimento, de 50 μ l, não foram completamente ingeridos pelas larvas demonstrando que possivelmente, elas apresentem um limite de ingestão de alimento necessário para seu desenvolvimento, neste caso representado pelo volume máximo de 40 μ l.

Os experimentos foram realizados a partir da transferência de larvas na fase pré-defecante, com cápsula cefálica medindo entre 0,866 e 1,143 mm, estas larvas além de serem mais resistentes à manipulação são encontradas com maior facilidade nos favos de cria. No entanto não podemos afirmar a idade das larvas utilizadas nas transferências. Embora algumas tentativas, infelizmente sem sucesso, tenham sido realizadas na esperança de obter estes dados, alguns fatores como a própria disposição dos favos de cria (em forma de cacho), a postura desordenada das células e a intolerância das operárias frente a estímulos externos como o manuseio e marcação das células, impossibilitaram a coleta dos dados. O fato de não sabermos exatamente a idade das larvas utilizadas nas transferências e a quantidade de alimento ingerido por elas anteriormente aos experimentos, talvez expliquem o nascimento de operárias nas transferências realizadas. Em estudos futuros pretendemos utilizar a colônia de módulos desenvolvida por Souza e Soares para desenvolver um método de observação de postura controlada da rainha, visando estudar o tempo de desenvolvimento dos imaturos dessa espécie a fim de aperfeiçoar e padronizar a técnica de produção de rainhas em laboratório.

Considerando que as larvas de operárias de *Frieseomelitta varia* possam se diferenciar em rainhas após consumir o alimento provisionado em sua célula, e adicionalmente o alimento da célula auxiliar, ambas de tamanhos similares (Faustino & Zucchi, 2002), supõe-se que as rainhas ingerem duas vezes mais alimento que as operárias durante o desenvolvimento larval. Verificamos que a quantidade média de alimento larval nas células de operária/macho é em média de $26,70 \pm 3,55 \mu$ l e, supondo que as larvas utilizadas nos experimentos ingeriram esta mesma quantidade anteriormente às transferências, verificamos que após o consumo de volumes extras de alimento ($32,50 \pm 6,45 \mu$ l) as larvas se diferenciaram em rainhas. Assim, o volume total médio de alimento necessário para a diferenciação de uma larva jovem de *F. varia* em rainha é de aproximadamente $59,20 \pm 5,00 \mu$ l, ou seja, a larva destinada a ser rainha consome 2,23 vezes mais alimento que a futura operária.

Em suma, estes resultados reforçam a teoria de que a determinação das castas nas abelhas da espécie *Frieseomelitta varia* depende exclusivamente da quantidade de alimento

fornecida à larva em desenvolvimento. Os dados encontrados em nosso trabalho são semelhantes a outros estudos a respeito do efeito da nutrição larval na determinação das castas das abelhas sem ferrão. De acordo com Prato (2007), as larvas de *Tetragonisca angustula* destinadas a se tornarem rainhas são alimentadas em média, 6,62 vezes mais (53 μ l) do que as futuras operárias (8 μ l); em *Trigona spinipes* as abelhas diferenciadas em rainhas consomem 10 vezes mais alimento que as operárias, a larva de rainha ingere em torno de 360 μ l de alimento, enquanto a larva de operária consome apenas 36 μ l do mesmo alimento (Buschini & Campos, 1995; Lisboa *et al.*, 2005). Estudos realizados com *Scaptotrigona quadripunctata* demonstraram que o fornecimento de doses extras de alimento às larvas de operárias, fez com que se desenvolvessem em rainhas (Camargo, 1972), Campos & Costa (1989) e recentemente Castilho-Hyodo (2001) verificaram ainda que, rainhas de *Schwarziana quadripunctata* podem emergir de células de operárias sendo resultantes de larvas que receberam uma quantidade de alimento maior, que aquela recebida pelas operárias.

No início dos experimentos, um dos fatores responsáveis pela grande mortalidade das larvas (68%) foi o efeito negativo da manipulação dos imaturos durante o processo de transferência da célula de cria para os poços da placa de Elisa contendo alimento larval, sendo que estas larvas apresentam uma película bastante delicada e susceptível à lesões. Entretanto, mesmo após adquirir habilidade considerável no manejo das larvas, a mortalidade dos indivíduos transferidos permanecia elevada. Verificamos que as larvas não ingeriam o alimento fornecido, pois esse havia solidificado, provavelmente devido à baixa umidade relativa do ar, razão pela qual passamos a controlar a umidade dos experimentos acondicionados em estufa, utilizando solução supersaturada de NaCl e água (1:1) nos experimentos seguintes, a partir daí não constatou-se mais a solidificação do alimento larval.

Em relação ao tempo de desenvolvimento dos indivíduos obtidos nos experimentos, verificamos que as rainhas (n= 56) levaram em média $29,25 \pm 2,63$ dias para emergir, o que corrobora com as observações realizadas por Faustino (2002) que acompanhou o processo de produção natural de duas rainhas de *F. varia*, desde a construção da célula auxiliar até a emergência dos adultos, levando 25 e 28 dias para completar seu desenvolvimento. As operárias por sua vez, apresentaram tempo menor de desenvolvimento, em média $22,56 \pm 2,38$ dias. O tempo total de desenvolvimento das rainhas foi maior do que o das operárias, pois está relacionado com o maior consumo de alimento ingerido pelas larvas de rainha (Camargo, 1972) que desencadeia tardiamente os processos de muda.

Quanto ao método empregado para a produção “*in vitro*” de rainhas, o sucesso no nascimento das larvas transferidas em placa tipo Elisa foi menor (32%) que o esperado. No

experimento realizado em agosto, houve mortalidade total das larvas transferidas (n=32), isto ocorreu porque o volume de alimento oferecido às larvas transferidas de 50µl foi superior à quantidade máxima ingerida por elas. Observamos que algumas larvas se afogaram no grande volume de alimento, e aquelas que conseguiram se alimentar não ingeriram todo o alimento. O restante de alimento larval não consumido em conjunto com as condições dentro da estufa tornou o ambiente propício ao desenvolvimento de fungos que proliferaram rapidamente causando a morte das larvas.

No entanto, os dados relacionados à alta mortalidade das larvas podem auxiliar no aprimoramento da técnica aqui utilizada em estudos futuros, quanto ao controle dos prováveis fatores responsáveis pela mortalidade dos imaturos, como: a contaminação por fungos e bactérias, seja no alimento ou em qualquer instrumento empregado no processo; a manutenção das condições de acondicionamento dos experimentos em estufa; o manuseio das larvas durante as transferências e afogamento dos imaturos em demasiadas quantidades de alimento.

Segundo Velthuis & Sommeijer (1991) em colônias naturais de abelhas sem ferrão não ocorre intercasta, uma vez que o resultado final da diferenciação das castas nos insetos sociais é o desenvolvimento de fêmeas muito diferenciadas, tanto em atributos morfológicos quanto comportamentais, ou seja, rainhas (funções reprodutivas) ou operárias (funções mantenedoras da colônia).

No entanto, a literatura afim registra escassos exemplos de ocorrência de intercastas em colônias naturais. De fato, neste aspecto, têm-se apenas as informações de Cappas e Sousa (1992) que encontrou intercastas em uma colônia de *Melipona quadrifasciata* e, Mateus e colaboradores (2002) em colônia natural de *Melipona seminigra* mantida em laboratório.

Com relação à intercastas obtidas em experimentos realizados sob condições controladas, também foram relatados alguns prováveis casos em espécies de meliponíneos, como por exemplo, em *Melipona beechei* (Velthuis *et al.*, 1991).

Em nosso estudo, não foi possível determinar com base em apenas um indivíduo produzido se o adulto obtido, portador de características combinadas de rainha e operária pertencia ou não a uma intercasta. Para tanto, seria necessário considerar outras características relacionadas à sua morfologia externa e interna.

Assim, o caráter recente da descoberta em *Frieseomelitta varia*, não permite o estabelecimento de bases sólidas para discutir adequadamente o problema das intercastas, entretanto, afirmam a importância do efeito nutricional na determinação da casta real nas abelhas desta espécie. Possivelmente, as operárias desta espécie sejam fêmeas subalimentadas

que uma vez ingerindo uma dose insuficiente de alimento durante seu desenvolvimento para produzir uma rainha completamente diferenciada, originam fêmeas estéreis com ovários totalmente degenerados ainda durante o período pupal, como verificado por Boleli e colaboradores (1999, 2000), demonstrando desta forma sua capacidade de totipotência.

4. Montagem e desenvolvimento de mini-colônias de *Frieseomelitta varia* utilizando as rainhas produzidas *in vitro*

Vários fatores como aqueles relacionados ao ataque de inimigos naturais, como formigas e algumas espécies de abelhas como *Scaptotrigona depilis*, bem como acidentes naturais causados por fenômenos climáticos, contribuíram para a mortalidade das rainhas introduzidas, e nestes casos em particular (8%) na morte de toda a população das mini-colônias. Em 15% dos casos, as rainhas produzidas não foram encontradas no ninho, provavelmente ao saírem para realizar o vôo nupcial, ou o vôo de reconhecimento da colônia possam ter sido predadas ou então não conseguiram localizar a colônia de origem.

Entretanto é interessante notar que as operárias foram responsáveis pela morte das rainhas introduzidas, em 77% dos casos, o que provavelmente está relacionado com a capacidade de reconhecimento entre os indivíduos do ninho, precisamente entre as operárias e a nova rainha virgem, uma vez que os insetos sociais exalam compostos que funcionam como assinaturas químicas individuais carregando informações a respeito da casta, idade, sexo e status reprodutivo (Howard & Blomquist, 2005).

O reconhecimento ocorre através de duas etapas principais: a liberação de uma pista pelo animal e o reconhecimento dela por um segundo indivíduo (Beecher, 1982). Os insetos sociais não são uma exceção à regra, o que pode ser facilmente entendido ao observarmos que, após uma rápida “antenação” as operárias são capazes de identificar os companheiros do ninho.

Diversos estudos comportamentais e químicos confirmam que as pistas utilizadas no reconhecimento são representadas por compostos associados à cutícula dos insetos (Breed & Stiller, 1992; Gamboa *et al.*, 1996) que é recoberta por uma camada de ceras impermeáveis constituída dos hidrocarbonetos (Lockey, 1988).

Nunes (2008) demonstrou que rainhas naturais recém emergidas de *Frieseomelitta varia* não possuem 16 compostos característicos presentes na cutícula de rainhas fisogástricas, em contrapartida apresentam 2 compostos que não são encontrados nos adultos. Os indivíduos de *F. varia* reconhecem pistas indesejadas no perfil cuticular daqueles não companheiros do

ninho, e essas pistas são as responsáveis pela rejeição dos indivíduos. Nessa proposta, a aceitação se dá não pela presença das pistas desejadas, mas sim pela ausência das indesejadas (Couvillon e Ratnieks, 2008; Nunes, 2008).

Os diversos odores presentes em uma colônia são absorvidos pela cera, e redistribuída por ela formando um odor homogêneo dentro do ninho. Breed *et al* (1995), estudando a cera das abelhas melíferas, concluíram que ela é o componente com maior importância na formação do padrão de hidrocarbonetos presentes na cutícula destas abelhas. Seguindo esta mesma linha, acredita-se que o cerume em colônias de *F. varia* também atue como unificador de compostos químicos presentes na colônia, por este motivo as rainhas produzidas em laboratório foram expostas a pequenas quantidades de cerume para que adquirissem o odor característico da colônia, na tentativa de auxiliar no processo de reconhecimento destas operárias. Segundo Nunes (2008) em experimentos de reconhecimento e análises químicas realizadas com indivíduos de *F. varia*, ocorre transferência de pistas utilizadas no reconhecimento através de um breve contato com o cerume. As análises químicas para os indivíduos que permaneceram por 10 minutos em contato com o cerume mostrou que a concentração de alguns compostos mudou, e outros foram adquiridos.

Quanto às interações rainha virgem – operárias, verificamos uma grande inquietação por parte das rainhas introduzidas que se movimentavam rapidamente no interior da colônia e eram intensamente assediadas pelas operárias. Este comportamento está de acordo com Imperatriz-Fonseca & Zucchi (1995) que observaram este comportamento em rainhas virgens de abelhas sem ferrão não pertencentes ao gênero *Melipona*. Além deste comportamento, observamos que a maioria das rainhas introduzidas apresentou outros três tipos de comportamentos distintos, embora nem sempre com a mesma intensidade ou frequência: 1) movimentação constante das asas, mesmo quando a rainha se encontrava parada, 2) agressividade contra as operárias e 3) as rainhas passavam as pernas posteriores sobre o abdome, esticando-o, provavelmente para estimular as glândulas responsáveis pela liberação do cheiro de atratividade da rainha.

Embora não tenhamos observado diretamente o vôo nupcial das rainhas produzidas que se estabeleceram nas mini-colônias (n=6), consideramos que elas haviam sido fecundadas a partir da observação da construção, provisionamento e presença de novas células operculadas. Segundo Ferreira (1993), a construção das primeiras células de cria está relacionada com o estímulo do vôo nupcial da rainha, a partir do qual estas estruturas começam a ser construídas após a fecundação da rainha.

Foi relatado anteriormente que alguns elementos, bióticos e abióticos, interferiram negativamente no sucesso das rainhas produzidas *in vitro*, no entanto, algumas rainhas se estabeleceram como fêmea dominante (n=6).

A disponibilidade de machos na natureza pode ter contribuído para o sucesso e estabelecimento das rainhas produzidas em condições controladas como fêmeas dominantes nas mini-colônias (Tabela XI).

Tabela XI: Meses nos quais ocorreu a fecundação das rainhas de *Frieomelitta varia* produzidas *in vitro*

Experimento de transferência das larvas	Mês referente à introdução da rainha virgem	Tempo (dias) decorrente até à fecundação	Mês referente à fecundação da rainha
julho	agosto	19	setembro
outubro	novembro	38	dezembro
fevereiro	março	58	maio
fevereiro	março	17	março
maio	junho	72	agosto
junho	Julho	27	agosto

Após a introdução das rainhas nas colônias órfãs, observamos que elas levaram em média $38,5 \pm 22,25$ dias para fecundar, fato confirmado através de observações diretas sobre a morfologia externa das rainhas, precisamente a visível dilatação da região abdominal.

Observando os dados acima, percebemos que em dois casos particulares: rainha introduzida em março e rainha introduzida no mês de junho, a fecundação ocorreu tardiamente, 58 e 72 dias após a introdução, respectivamente. As demais rainhas introduzidas em agosto, novembro, março e julho, fecundaram em média três vezes mais rápido ($22,75 \pm 5,56$ dias).

A relação entre os meses em que ocorreu a fecundação das rainhas virgens produzidas e os meses de produção natural de machos em colônias de *F. varia* estão representados na Figura 20.

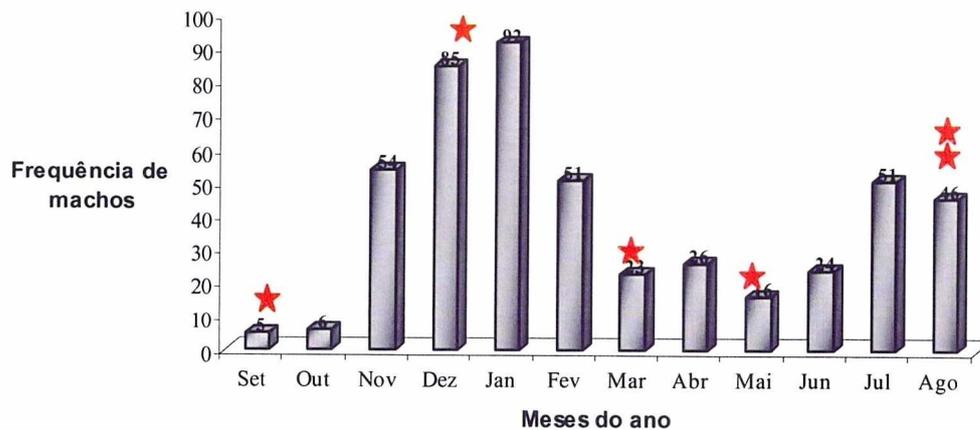


Figura 20: Frequência de machos de *Frieseomelitta varia*, em estágio de pupa, nos meses de coleta dos dados (12 meses). As marcações em vermelho indicam os meses em que as rainhas produzidas foram fecundadas (n=6).

5. Produção de machos em colônias naturais de *Frieseomelitta varia*

A produção sazonal de sexuados nos insetos sociais é um evento dependente de interações complexas entre fatores intra e extra coloniais (van Veen *et al.*, 1999). De acordo com Bego (1977, 1982, 1990) e van Veen *et al.* (1990), a produção natural de machos ocorre em condições específicas relacionadas à produtividade da rainha, à densidade populacional e quantidade de pólen armazenado nas colônias de meliponíneos.

Como resultado da verificação da razão sexual em três colônias de *F. varia*, observamos que a produção de machos durante os doze meses de estudo ocorreu constantemente, tanto nas colônias (individualmente) quanto na população (colônias agrupadas). Entretanto, observamos uma variação na frequência de pupas de machos em relação ao de operárias entre os meses, sendo setembro e outubro os meses de menor frequência (4%), e dezembro, janeiro e julho os meses de maior frequência (45, 46 e 45 %, respectivamente).

A ocorrência de machos ao longo de todo o ano, também foi relatada em *Scaptotrigona postica* (Kerr *et al.*, 1962; Bego, 1977, 1982, 1990), em *Melipona subnitida* (Contel & Kerr, 1976), *Scaptotrigona depilis* (Lacerda, 2000); *Plebeia remota* (Alves *et al.*, 2004) e *Trigona (Lepidotrigona) ventralis* (Chinh & Sommeijer, 2005).

Em algumas espécies, entretanto, a produção de machos tem se mostrado sazonal como, por exemplo: *Melipona favosa* (Fabricius) (Sommeijer *et al.*, 1999); *Trigona nigra* var. *paupera* Provancher (Sommeijer *et al.*, 1984); *Melipona beecheii* Bennett (van Veen *et al.*, 1990;1992), *Leurotrigona muelleri* Friese (Terada, 1974); *Melipona quadrifasciata*

(Camargo, 1976 e Bezerra, 1995), *Plebeia (Friesella) schrotkyi* Friese (Camillo-Atique, 1977) e *Schwarziana quadripunctata* (Alves & Imperatriz-Fonseca, 2005).

Velthuis *et al.* (2005) reviram os padrões de produção de machos em algumas espécies de abelha sem ferrão e verificaram que os períodos cíclicos de produção de machos (MPP) ocorrem em colônias individuais, também observado em *Melipona favosa* (Chinh *et al.*, 2003) e *Melipona bicolor* (Alves, 2004), embora isto não reflita no contexto populacional, ou seja, geralmente a produção de machos ocorre continuamente ao longo do ano.

A respeito da influência de fatores externos na produção de machos, Bego (1982) aponta que os fatores extrínsecos à colônia como a temperatura e precipitação, que desempenham papel na disponibilidade de alimento no ambiente, não são os fatores determinantes na produtividade de machos; segundo a autora, os fatores intrínsecos como a densidade populacional da colônia, que pode ser consequência do estoque de pólen e mel, são os fatores determinantes.

Em seu estudo com *Melipona beecheii*, Moo Valle *et al.* (2001) testando o efeito da nutrição na produção de sexuais, observaram que as colônias pouco alimentadas produziram 0,7% de machos na população, enquanto as colônias superalimentadas produziram 23,4%, concluindo que as reservas de alimento tem forte influência na produção dos machos.

É válido ressaltar que, as células de cria coletadas mensalmente nas colônias de *F. varia* eram compostas por células que continham abelhas nos estágios de pupa. Observamos que as pupas de macho coletadas levaram em média 14 a 20 dias para completar seu desenvolvimento e emergir do casulo. Portanto, devemos considerar que na natureza, os indivíduos adultos que estão aptos a desempenharem seu papel reprodutivo, serão encontrados no mês seguinte ao da coleta dos dados aqui apresentados

Os dados obtidos acerca da produção de machos em *Frieseomelitta varia*, são importantes pois sabendo as épocas de maior disponibilidade de machos na natureza, podemos sincronizar com a produção “*in vitro*” das rainhas, aumentando o sucesso no estabelecimento das mini-colônias, haja vista que, algumas rainhas produzidas *in vitro* e que foram introduzidas desapareceram do ninho, provavelmente não haviam machos próximos para realizar a cópula e, ao saírem para realizar o vôo nupcial, por longo tempo se perderam ou foram predadas.

Como mencionado anteriormente, a quantidade de alimento estocado nas colônias, influenciam na produção de sexuais, entretanto, não observamos escassez de alimento nas colônias de *Frieseomelitta varia* utilizadas na coleta dos dados, mesmo porque as abelhas desta espécie são conhecidas por serem excelentes coletoras de pólen e as colônias foram

selecionadas para este estudo considerando suas condições internas de estoque de alimento. Contudo, estudos mais detalhados a respeito de tal tema devem ser realizados, para que a influência do alimento estocado na produção de sexuais nesta espécie possa ser esclarecida.

VI- CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

Em uma célula de operária/macho de *Frieseomelitta varia*, é depositado em média $26,7 \pm 3,55$ μ l de alimento larval. Entretanto, a quantidade de alimento provisionado nas células pode variar dependendo da estação do ano (seca ou chuvosa) e da disponibilidade de recursos alimentares.

A hipótese da presença de quatro instares larvais para as abelhas da espécie *Frieseomelitta varia*, representou o melhor ajuste dos dados, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,98 e média da razão de crescimento (K) igual a 1,37. Assim, as larvas amostradas neste estudo apresentaram intervalos de largura da cápsula cefálica entre 0,333 - 0,429 mm como sendo o primeiro instar; 0,476 - 0,577 mm o segundo; 0,650 - 0,762 mm o terceiro e, 0,866 - 1,143 mm o quarto e último instar larval.

O desenvolvimento das larvas transferidas (em fase tardia de desenvolvimento) em rainha ocorre a partir da ingestão de 25 até 40 μ l de alimento larval extra, desta forma as larvas que darão origem a rainhas se alimentam em média 2,23 mais que as larvas que se desenvolverão em operárias.

Em relação ao tempo de desenvolvimento dos indivíduos obtidos nos experimentos, verificamos que as rainhas produzidas sob condições controladas (n= 56) levaram em média $29,25 \pm 2,63$ dias para emergir. As operárias por sua vez, apresentaram tempo menor de desenvolvimento, em média $22,56 \pm 2,38$ dias.

Com base em apenas um indivíduo de *F. varia* produzido, portador de características combinadas de rainha e operária, não é possível afirmar se pertencia ou não a uma intercasta. Sugerimos que novos experimentos sejam realizados a fim de se produzir maiores quantidades destes indivíduos para que sejam analisados detalhadamente.

A maioria das rainhas produzidas “*in vitro*” que foram introduzidas nas mini-colônias apresentaram comportamentos semelhantes ao de rainhas virgens naturais quando se encontravam na presença das operárias.

Após a introdução das rainhas virgens produzidas nas mini-colônias, elas levaram em média $38,5 \pm 22,25$ dias para fecundar.

Machos de *Frieseomelitta varia* são produzidos constantemente ao longo do ano, embora ocorra uma variação na sua produção natural em alguns meses. Encontramos uma menor frequência de pupas de machos nos meses de setembro e outubro, por outro lado nos meses de dezembro, janeiro e julho a ocorrência destes indivíduos em relação as operárias foi maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D. A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. One year-study on the production of sexuals in a stingless bee species, *Schwarziana quadripunctata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). In: ABSTRACTS HANDBOOK OF ASSOCIATION FOR TROPICAL BIOLOGY AND CONSERVATION, p. 103, 2005.

ALVES, D. A. **Produção de operárias, rainhas e machos em *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Apidae, Meliponini)**. 2004. Trabalho de conclusão do curso, apresentada à Universidade Presbit. Mackenzie, São Paulo, 2004.

ALVES, D. A.; RIBEIRO, M. F.; SANTOS-FILHO, P. S.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L. Production of gynes and males in *Plebeia remota* Holmberg, 1903 (Apidae, Meliponini), In: PROC. 8TH IBRA INT. CONF. ON TROPICAL BEES AND VI ENCONTRO SOBRE ABELHAS, Ribeirão Preto: **Funpec**, p. 753, 2004.

AZEVEDO, G. G. **Atividade de vôo e determinação do número de ínstares larvais em *Partamona helleri* (Friese) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1997. 64 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

BEECHER, M. D. Signature systems and kin recognition. **American Zoologist**, v. 22, p. 477-490, 1982.

BEETSMA, J. The process of queen-worker differentiation in the honey bee. **Bee World**, v. 60, p. 24-39, 1979.

BEGO, L. R. On social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille, with special reference to productivity of colonies (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Bras. Entomol.**, v. 34, p. 721-738, 1990.

BEGO, L. R. **Aspectos da regulação social em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1977. 180 f. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1977.

BEGO, L. R. On social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille, with special reference to male production cycles (Hym., Apidae, Meliponinae). **Bol. Zool.**, São Paulo, v. 7, p. 181-196, 1982.

BEIG, D. The production of male in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. **Jour. Apic. Res**, v. 11, n. 1, p. 33-39, 1972.

BOLELI, I. C.; PAULINO-SIMÕES, Z. L.; BITONDI, M. M. G. Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. **J. Morphol**, v. 242, n. 3, p. 271-82, 1999.

BOLELI, I. C.; PAULINO-SIMÕES, Z. L.; BITONDI, M. M. G. Regression of the lateral oviducts during the larval adult transformation of the reproductive system on *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*. **J. Morphol.** v. 243, p. 141 – 151, 2000.

BOURKE, A. F. G. Worker reproduction in the highly eussocial Hymenoptera. **Quart. Rev. Biol.**, v. 63, p. 291 – 311, 1988.

BREED, M. D., STILLER, T. M. Honey bee *Apis mellifera*, nestmate discrimination: Hydrocarbon effects and the evolutionary implications of comb choice. **Anim. Behav.**, v. 43, p. 875-883, 1992.

BREED, M. D.; GARRY, M. F.; PEARCE, A. N.; HIBBARD, B. E.; BJOSTAD, L. B.; PAGE, R. E. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. **Anim. Behav.**, v. 50, p. 489-496, 1995.

BUSCHINI, M. L. T., CAMPOS, L. A. O. Caste determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae): influence of the available food and the juvenile hormone. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 55, p. 121 -129, 1995.

CAMARGO, C. A. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 32, p. 133-138, 1972.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae: a mini review. **Apidologie**. v. 23, p. 509-522, 1992.

CAMILLO-ATIQUÉ, C. **Estudo da variabilidade etológica de *Friesella* incluindo a caracterização de espécies crípticas (Hym., Meliponinae)**. 1977. 203 f. Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1977.

CAMPOS, L. A. O. & COSTA, M. A. Determinação do sexo em abelhas: XXVIII. Determinação das castas em *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 49, n. 4, p. 999-1001, 1989.

CAPPAS E SOUSA, J. P. Os Meliponíneos em Portugal e na Europa. In: **Anais do V Congresso Ibérico de Entomologia**. Lisboa, p. 53-68, 1992.

CASTILHO-HYODO, V. C. C. **Rainha ou operária? Um ensaio sobre a determinação de castas em *Schwarziana quadripunctata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2001. 134 f. Tese (Doutorado em Ecologia), apresentada ao Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

CHINH, T. X. & SOMMEIJER, M. J. Production of sexuals in the stingless bee *Trigona (Lepidotrigona) ventralis flavibasis* Cockerell (Apidae, Meliponini) in northern Vietnam. **Apidologie**. v. 36, p. 493-503, 2005.

CHINH, T. X.; GROB, G. B. J., MEEUWSEN, F. J. A. J.; SOMMEIJER, M. J. Patterns of male production in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 34, p. 161–170, 2003.

COLE, J. B. Growth ratios in holometabolous and hemimetabolous insects. In: **Annals of the Entomological Society of America**. v. 64, p. 540-544, 1980.

CONTEL, E. P. B.; KERR, W. E. (1976). Origin of males in *Melipona subnitida* estimated from data of an isozymic polymorphic system. **Genética**, v.46, p. 271-277, 1976.

CORTOPASSI-LAURINO, M. et al. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275-292, 2006.

CORTOPASSI-LAURINO, M. Observações sobre atividades de machos de *Plebeia droryana* Friese (Apidae, Meliponinae). **Rev. Bras. Entomol.** v. 24, p. 177-191, 1979.

COUVILLON, M. J., RATNIEKS, F. L. W. Odour transfer between colonies of the stingless bee *Frieseomelitta varia* demonstrates that entrance guards use an “undesirable-absent” cue recognition system. **Behavioural Ecology and Sociobiology**, 2008 (accepted).

CRUZ–LANDIM, C. Ovarian development in Meliponinae bees (Hymenoptera: Apidae) the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, n. 1, p. 83-88, 2000.

DARCHEN, R. & DELAGE-DARCHEN, B. Contribution à l'étude d'une abeille du Mexique *Melipona beecheii* B. (Hymenoptère : Apide). **Apidologie**, v. 6, p. 295–339, 1975. *apud* ROSSINI, S. A. **Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos corpora allata de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae)**. 1989. 82 f. Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 1989.

DYAR, H. G. The number of molts of Lepidopterous larvae. **Psyche**. v. 5, p. 420-422. 1980.

ENGELS, W.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Caste development, reproductive strategies and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: ENGELS, W. (ed.), **Social Insects**: Springer-verlag, Berlin, p 167-230, 1990.

FAUSTINO, C. D.; SILVA-MATOS, E. V.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R. First record of emergency queen rearing in stingless bees. **Insectes Soc.** v. 49, p. 111-113, 2002.

FAUSTINO, C. D.; ZUCCHI, R. **Mini-colônias de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) e sua utilização na solução de problemas bionômicos.** 2002. 67 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

FERREIRA, F. H. N. **Aspectos da estratégia reprodutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).**1993. 40 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1993.

GAMBOA, J. G.; GRUDZIEN, T. A.; ESPELIE, K. E.; BURA, E. A. Kin recognition in social wasps: combining chemicals and behavioral evidence. **Animal Behaviour**, v. 51, p. 625-629, 1996.

HARTFELDER, K. et al. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**. v. 37, n. 2, p. 144-163, 2006.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. The composition of larval food in stingless bees: Evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insectes Sociaux**, v. 36, p. 1-14, 1989.

HOWARD, R. W., BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of arthropod hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 371-393, 2005.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & ZUCCHI, R. Virgin queens in stingless bees (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. **Apidologie**, v. 26, p. 231-244, 1995.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CONTRERA, F. A. L.; KLEINERT, A. M. P. A Meliponicultura e a iniciativa Brasileira dos polinizadores. In: ANAIS DO XV CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA E 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTORES, Natal, 2004.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D.; FREITAS, B. F.; CASTRO, M. S.; SANTOS, I. A.; VENTURIERI, G. C. Abelhas e desenvolvimento rural no Brasil. **Rev. Mensagem Doce**, v. 80, p. 03-08, 2005.

KERR, W. E. Estudos sobre o gênero *Melipona*. In: **An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz"**. v. 5, n. 2, p. 181-276, 1948.

KERR, W. E. Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). **Evolutionary Biology**, v. 3, p. 119-175, 1969.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha Uruçu: Biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: **Fundação Acangaú**, p. 143, 1996.

KERR, W. E.; NIELSEN, R. A. Evidence that genetically determined *Melipona* queens can become workers. **Genetic**. v. 54, p. 859-865, 1966.

KERR, W. E.; STORT, A. C.; MONTENEGRO, M. J. Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas do gênero *Melipona*. **Acad. Bras. Ciênc.**, v. 38, p. 149-168, 1966.

KERR, W. E.; ZUCCHI, R.; NAKADAIRA, I. T.; BUTOLO, J. E. Reproduction in the social bees. **J. N. Y. Entomol. Soc.** v. 70, p. 265-276, 1962.

KOEDAM, D. et al. Behavioural and physiological implications of queen dominance in stingless bees. Utrecht: **Universiteit Utrecht**. p. 109, 1995.

KOEDAM, D. et al. The behaviour of laying workers and the morphology and viability of their eggs in *Melipona bicolor bicolor*. **Physiol. Entomol.** v. 26, n. 3, p. 254-259, 2001.

KOEDAM, D., CONTRERA, F. A. L.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Clustered male production by workers in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponinae). **Insectes Soc.**, v. 46, p. 387-391, 1999.

KOEDAM, D.; CONTRERA, F. A. L.; FIDALGO, A. O.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. How queens and workers share in male production in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini). **Insectes Soc.** v. 52, p. 114-121, 2005.

LACERDA, L. M. **Morfometria e morfologia de ovos e aspectos relacionados à reprodução de *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae,**

Meliponinae). 2000. 73 f. Tese apresentada à Facul. Filos. Ciên. Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

LACERDA, M. L. & SIMÕES, L. P. Z. Ovos produzidos por rainhas e operárias de *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina): morfometria e aspectos relacionados. **Iheringia**, v. 96, n. 1, p. 89-93, 2006.

LIDLAW, H. H.; GOMES, F. P.; KERR, W. E. Estimation of the number of lethal alleles in a panmictic population of *Apis mellifera*. L. **Genetics**, v. 41, p. 179-188, 1956.

LISBOA, L. C. O.; SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C.; CAMPOS, L. A. O. Effect of larval food amount on ovariole development in queens of *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apinae). **Anat. Histol. Embriol.**, v. 34, p. 179-184, 2005.

LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparable Biochemistry and Physiology**, v. 89B, p. 595-645, 1988.

MATEUS, S.; HRNCIR, M.; FAUSTINO, C. D.; ZUCCHI, R. Ocorrência de intercastas adultas em colônias de *Melipona seminigra*: aspectos morfo-etológicos preliminares (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). In: ANAIS DO V ENCONTRO SOBRE ABELHAS, Ribeirão Preto, p. 211-216, 2002.

MICHENER, C. D. Observations on the nests and behavior of *Trigona* in Australia and New Guinea. **American Museum Novitates**, v. 2026, p. 1-46, 1961.

MICHENER, C. D. The bees of the world. Baltimore: **The Johns Hopkins University Press**, p. 913, 2000.

MICHENER, C. D. The social behavior of the bees: a comparative study. Cambridge, Massachusetts: **Belknap Press of Harvard Univ. Press**, p. 404, 1974.

MOO-VALLE, H.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G.; WENSELEERS, T. The effect of food reserves on the production of sexual offspring in the stingless bee *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini). **Insectes Sociaux**, v. 48, p. 398-403, 2001.

NEVES, N. A., CRUZ-LANDIM, C. Determinação do número de estágios de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). **Ciê. Cult.**, v. 36, p. 912, 1984.

NIJHOUT, H. F.; WHEELER, D. F. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. **The Quartely Review of Biology**, v. 57, n. 2, p. 109-133, 1982.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: **Nogueirapis**, p. 445, 1997.

NUNES, T. M. **Reconhecimento parental em abelhas eussociais Neotropicais (Hymenoptera: Apinae, Meliponini): uma análise dos mediadores químicos e seus determinantes em *Frieseomelitta varia***. 2008. 52 f. Dissertação apresentada à Facul. Filos. Ciên. Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

OLIVEIRA, B. L. Mudanças ontogenéticas em larvas de *Melipona nigra schenki* Gribodo (Hymenoptera, Apoidea). **Boletim da Universidade do Paraná - Zoologia**, v. 2, p. 1-16, 1960.

PARRA, J. R. P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZZI, A. R. & PARRA, J. R. P. (ed.). Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. São Paulo: **Manole**, p. 9-65, 1991.

PARRA, J. R. P.; HADDAD, M. L. Determinação do número de instares de insetos. Piracicaba: **FEALQ**, p. 49, 1989.

PAXTON, R. J.; BEGO, L. R.; SHAH, M. M.; MATEUS, S. Low mating frequency of queens in the stingless bee *Scaptotrigona postica* and worker maternity of males. **Behav. Ecol. Sociobiol.** v. 53, p. 174-181, 2003.

PRATO, M. **Produção artificial de rainhas em *Tetragonisca angustula* Latreille 1811 (Hymenoptera, Apidae)**. 2007. 57 f. Trabalho de conclusão do curso (Biologia) apresentada à Facul. Filos. Ciên. Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

ROSSINI, S. A. **Caracterização das mudas ontogenéticas e biometria dos *corpora allata* de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Hymenoptera, Apidae)**. 1989. 82 f. Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 1989.

ROSSINI, S. A., BUENO, O. D. Mudanças ontogenéticas nos Meliponinae: *Melipona compressipes* (Hymenoptera, Apidae). **Ciê. Cult.**, v. 38, p. 845, 1986.

ROUBIK, D. W. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge: **Cambridge University Press**, p. 514, 1989.

SAKAGAMI, S. F. & ZUCCHI, R. Estudo comparativo do comportamento de várias espécies de abelhas sem ferrão, com especial referência ao processo de aprovisionamento e postura das células. **Ciência e Cultura**, v. 18, p. 283-296, 1966.

SAKAGAMI, S. F. & ZUCCHI, R. Oviposition process in a stingless bee *Trigona (Scaptotrigona) postica* (Hymenoptera). **Studia Entomológica**, v. 6, n. 1/4, p. 497-510, 1963.

SAKAGAMI, S. F. Stingless bees In: Hermann H.R. (Ed.), Academic Press, New York: **Social Insects**, v. 3, p. 361-423, 1982.

SILVA, D. L. N.; ZUCCHI, R.; KERR, W. E. Biological and behavioral aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Anim.Behav.**, v. 20, p. 123-132, 1972.

SOMMEIJER, M. J.; BRUIJIN, L. L. M.; MEEUWSEN, F. J. A. M.; MARTENS, E. P. Natural patterns of caste and sex allocation in the stingless bees *Melipona favosa* and *Melipona trinitatis* related to worker behaviour. **Insectes Soc.**, v.50, p. 38-44, 2003.

SOMMEIJER, M. J.; BUREN, N. J. M. VAN. Male production by laying workers in queenright colonies of *Melipona favosa* (Apidae, Meliponinae), In: Billen J. (Ed.), **Biology and Evolution of Social Insects**, Leuven Univ. Press, p. 89-97, 1992.

SOMMEIJER, M. J.; CHINH, T. X.; MEEUWSEN, F. J. A. J. Behavioural data on the production of males by workers in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Meliponinae). **Insectes Soc.**, v. 46, p. 92-93, 1999.

SOMMEIJER, M. J.; VAN ZEIL, M. & DOHMEN, M. R. Morphological differences between worker – laid eggs from a queenright colony and queenless colony of *Melipona rufiventris paraensis* (Hymenoptera: Apidae). **Entomologische Berichten**, v. 44, n. 1, p. 91-95, 1984.

SUKA, T.; INOUE, T. Nestmates recognition of the stingless bee *Trigona (Tetragonula) minangkabau* (Apidae: Meliponinae). **Journal of Ethology**, v. 11, p. 141-147, 1993.

TAMBASCO, A. J. **Aspectos do processo reprodutivo e da citologia de fêmeas de meliponíneos**. 1975. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1975.

TERADA, Y. (1974). **Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona mulleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae)**. 1974. 96 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1974.

TÓTH, E.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; STRASSMANN, J. E. Genetic and behavioral conflict over male production between workers and queens in the stingless bee *Paratrigona subnuda*. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 53, p. 1-8, 2002.

TÓTH, E.; QUELLER, D. C.; DOLLIN, A.; STRASSMANN, J. E. Conflict over male parentage in stingless bees. **Insectes Soc.**, v. 51, p. 1-11, 2004.

VEEN, J. W. VAN & SOMMEIJER, M. J. Tropical beekeeping: the production of males in stingless bees (*Melipona*). Amsterdam: NEV, **Proc. Exper. & Appl. Entomol.**, v. 1; p. 171-176, 1990.

VEEN, J. W. VAN; ARCE, H. G. & SOMMEIJER, M. J. Brood production in *Melipona beecheii* in relation to dry season foraging. In: **Biology and Evolution of Social Insects**, J. Billen Editor, Leuven University Press, p. 81-88, 1992.

VEEN, J. W. VAN; SOMMEIJER, M. J. & ARCE, H. G. **The role of colony development and resource availability in the regulation of queen production in *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini)**. In: Colony Reproduction in Stingless Bees, 1999. p.79-87. PhD. Dissertation, Faculty of Biology, Utrecht University, 1999.

VEEN, J. W. VAN; SOMMEIJER, M. J.; MEEUWSEN, F. Behavior of drones in *Melipona* (Apidae, Meliponinae). **Insectes Soc.**, v. 44, p. 435-447, 1997.

VELTHUIS, H. H. W. & SOMMEIJER, M. J. Roles of morphogenetic hormones in caste polymorphisms in stingless bees. In: **Rutgers University Press**, New Jersey: New Brunswick, v. 9, p. 346-383, 1991.

VELTHUIS, H. H. W. *Biologia das abelhas sem ferrão*. São Paulo: **Edusp**, v. 33. 1997.

VELTHUIS, H. H. W.; KOEDAM, D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. **Apidologie**, v. 36, p. 169-185, 2005.

WAULDBAUER, G. P. The growth and reproduction of maxillectomized tobacco hornworms feeding on normally reject non-solanaceous plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 5, p. 147-158, 1962.

WEAVER, N. Physiology of caste determination. **Ann Rec. Entomol.**, v. 11, p. 79-102, 1966.

WIRTZ, P.; BEETSMA, J. Introduction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera*) by juvenile hormone. **Entomology Experiment Application**, v. 15, p. 517-520, 1972.

ZUCCHI, R. **Aspectos etológicos evolutivos da bionomia de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae)**. 1977. 204 f. Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 1977.

ZUCCHI, R.; SILVA-MATOS, E. V.; NOGUEIRA-FERREIRA, F. H.; AZEVEDO, G. G. On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees, nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Sociobiology**, v. 34, p. 65-86, 1999.