UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Mecanismos e estratégias de defesa em *Tetragonisca angustula*
(Hymenoptera: Apidae)”

Versão Corrigida

Luana Leite Guimarães Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação
em Entomologia

Ribeirão Preto - SP

(2019)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Mecanismos e estratégias de defesa em *Tetragonisca angustula*
(Hymenoptera: Apidae)”

Luana Leite Guimarães Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento

Ribeirão Preto - SP

(2019)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Santos, Luana Leite Guimarães

Mecanismos e estratégias de defesa em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae).

Ribeirão Preto, 2019. 90 pg.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Orientador: Fábio Santos do Nascimento

1-Comportamento de defesa. 2-Soldados. 3-Socialidade.

*There is no such thing as a painless lesson.
They just don't exist. Sacrifices are necessary.
You can't gain anything without losing something first.
Although, if you can endure that pain and walk away from it,
you'll find that you now have a heart strong enough to overcome any obstacle.
A heart made full metal."*

Edward Elric

Aos meus pais, Luciana e Rui,

à meus avos, Lucília e Amir,

e a meus irmãos.

Dedico...

Agradecimentos

Mae, pai, vocês são minha vida. Não existem palavras suficientes para agradecer tamanho apoio. Obrigada por sempre estarem presentes, por todos os sacrifícios, por me incentivarem a buscar o melhor, vocês são minha base.

As amizades construídas durante todo este tempo, obrigada por compartilharem os almoços, por tantas gargalhadas, baladinhas. Muito obrigada por serem companheiros e pacientes quando foi mais necessário. Por tornarem as coisas muito mais divertidas. Aos antigos estagiários do laboratório, que hoje são mestrandos e seguem trabalhando com comportamentos de insetos sociais. Obrigada Jeff, Will, Pepito que estavam sempre dispostos a dar uma mãozinha na realização dos testes.

Aos mestres e doutores por me ensinarem tanto, por me auxiliar com os testes estatísticos, com a redação e conclusão deste trabalho. Obrigada Diego, Bruno, Lohan, vocês foram muito importantes, obrigada pelo apoio, pela dedicação e paciência.

Ao Christopher, Francisca e Robbie pela incrível ajuda no início dos meus estudos, ideias e momentos de reflexão, acompanhamento, amparo e por todo carinho.

Ao Sidnei, Nelsin, você foi essencial não só nas questões do projeto, mas também nas questões da vida, obrigada por me fazer enxergar as coisas de outra maneira e por alegrar o laboratório sempre assoviando pelos corredores.

Ao Prof. Dr. Fabio Santos Nascimento pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela orientação, compreensão, apoio e paciência.

A Renata e a Vera que sempre conseguiam tirar nossas duvidas, a correr com os prazos, por entender o desespero dos pós-graduandos.

A Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras de Ribeirão Preto/SP e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia, por tornar possível o trabalho desenvolvido e pelo suporte oferecido.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico) pelo financiamento.

O meu muito obrigada

RESUMO

Santos, L.L.G. Mecanismos e estratégias de defesa em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae). 2019. 90pg. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os ninhos de insetos sociais contêm recursos valiosos armazenados e são frequentemente alvos de outros animais. As abelhas sem ferrão (Meliponini) apresentam muitas adaptações organizacionais para a defesa do ninho. A espécie *Tetragonisca angustula* possui uma sofisticada estratégia de defesa da colônia executada por operárias diferencialmente maiores (polietismo morfológico) em comparação com as demais da mesma casta. Essas guardas podem adotar duas estratégias distintas, pairando perto da entrada (guardas voadoras, GV) ou sentado no tubo de entrada (guardas fixas, GF). Ambos os tipos de guardas atacam inimigos em potencial, reconhecidos por suas cores e odores, que tentam invadir o ninho. As sensilas das antenas são responsáveis por perceber os estímulos químicos dispersos no ar. Nesse sentido, o tamanho corporal pode influenciar a eficácia de reconhecimento de indivíduos hetero e coespecíficos, pois quanto maior a superfície antenal maior a quantidade de sensilas olfativas. Buscamos entender melhor os papéis exercidos pelos dois fenótipos comportamentais de guardas na defesa da colônia, ...em relação às seguintes circunstâncias: Tipo de invasor (alado ou áptero), ao modo de aproximação (voando e caminhando), o comportamento mediante o inimigo natural *Lestrimelitta limao* e outras espécies potencialmente predadoras e neutras além de examinar a influência do tamanho corporal da guarda em sua capacidade de reconhecimento sensorial e os mecanismos de defesa contra os intrusos. Buscamos compreender melhor os mecanismos de defesa e reconhecimento de intrusos. Os resultados obtidos revelam que as guardas apresentaram respostas distintas frente aos intrusos e ao modo de apresentação destes, onde intrusos alados, caminhando, provocam mais respostas das GF, já as GV reagiram quando os intrusos aproximaram voando, de maneira complementar. A presença de *L. limao* gerou alta proporção de recrutamento e respostas comportamentais agressivas de *T. angustula*, sugerindo especialização. As respostas apresentadas para os intrusos de cores e morfologia diferentes dos coespecíficos sugerem que GV e GF têm a capacidade de reconhecimento e semelhante. Observamos ainda que guardas maiores cometem menos erros de reconhecimento, sendo assim, esta subcasta desempenha de modo eficiente a proteção da colônia o que consequentemente pode aumentar suas chances de sobrevivência.

Palavras-Chave: comportamento de defesa, soldados, socialidade

ABSTRACT

Santos, L.L.G. Mechanisms and strategies of defense in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae). 2019. 90pg. Dissertation (Master's). Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto of the University of São Paulo

Nests of social insects have valuable resources which are often attacked by invertebrates and vertebrates. Stingless bees (Meliponini) have many organizational adaptations for nest defense. The species *Tetragonisca angustula* has a sophisticated colony defense strategy carried out by differentially larger operária (morphological polyethyism) compared to the others of the same caste. These guards can adopt two distinct strategies, hovering near the entrance (hovering guards, GV) or sitting on the entrance tube (stand guards, GF). Both types of guards attack potential enemies, recognized for their colors and odors, as they attempt to invade the nest. Antenna sensillae are responsible for perceiving chemical stimuli dispersed in the air. In this sense, body size may influence the recognition efficiency of hetero and co-specific individuals, because the larger the antenal surface the greater the amount of olfactory sensilla. We seek to better understand the roles played by the two behavioral phenotypes of guards in the defense of the colony, in relation to the following circumstances: Type of invader (winged or asteroid), approach mode (flying and walking), behavior by natural enemy *Lestrimelitta limao* and other potentially predatory and neutral species in addition to examining the influence of guard body size on their sensory recognition ability and defense mechanisms against intruders. We seek to better understand the mechanisms of defense and recognition of intruders. The results show that the guards presented different responses to the intruders and their mode of presentation, where winged intruders, walking, elicit more responses from the FG, while the GV reacted when the intruders approached in a complementary manner. The presence of *L. limao* generated high proportion of recruitment and aggressive behavioral responses of *T. angustula* guards, suggesting specialization. The responses presented for intruders of different color and morphology suggest that GV and GF have recognition capability and the like. We also observed that larger guards make fewer recognition errors, so this subcast efficiently protects the colony, which consequently increases the likelihood of colony survival.

Key-words: Defense behavior, soldiers, sociality

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Modelo de estudo	12
2. OBJETIVO	17
1.1.1. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Local de estudo, Período dos Testes e Bioensaios	18
3.2. Registro e contagem das guardas.....	21
3.2.1. Comportamentos	22
3.2.2. Latência de ataques	22
3.3. Apresentação das iscas.....	23
3.3.1. Modos de apresentação das iscas	23
3.3.2. Espécies-iscas	24
3.4. Relação tamanho corporal e capacidade de reconhecimento.....	30
3.4.1. Local de estudo.....	31
3.4.2. Reconhecimento	31
3.4.3. Tamanho corporal.....	32
3.5. Análises estatísticas.....	34
3.5.1. Respostas Comportamentais.....	35
3.5.2. Capacidade sensorial	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Variação na frequência de guardas durante o estudo.....	37
4.1.1. Influências climáticas	38
4.2. Bioensaios.....	40
4.2.1. Atos comportamentais observados durante os experimentos	40
4.2.2. Flutuação Numérica entre tratamentos	43
4.2.3. Respostas comportamentais.....	47
4.2.4. Respostas Comportamentais entre tratamentos	61
4.3. Relação tamanho e capacidade de reconhecimento.....	69
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

As abelhas (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila (Grimaldi & Engel 2005) Apoidea) compreendem um dos grupos mais diversos dos himenópteros aculeados, abrangendo cerca de 20.000 (vinte mil) espécies conhecidas (Michener 2007). As abelhas solitárias compõem a maior parte deste grupo (Cardinal & Danforth 2013, Kocher & Paxton 2014), porém o conhecimento público (não acadêmico) é geralmente associado as espécies sociais, em decorrência do valor comercial de produtos alimentícios como o mel, bem como pela polinização e produção agrícola (Grimaldi 1999, Michener 2007).

O amplo espectro biológico-comportamental e adaptações para vida coletiva existente em abelhas (grupal / em conjunto) motiva muitos estudos relacionados a evolução da socialidade (Sann *et al.* 2018; Danforth & Sipes 2006, Cardinal & Danforth 2011, 2013). A eussocialidade é caracterizada pela sobreposição de gerações, separação de casta reprodutiva e estéril, divisão de trabalho, cooperação no cuidado dos imaturos, colônias perenes (Michener 1974). Johnson *et al.* (2013) sugere que Formicidae (formigas) é grupo irmão de Apoidea (abelhas e vespas Eufeciformes), os quais compartilham características comportamentais não exibidas por Vespidae e a alta frequência encontrada de eussocialidade em formigas (Johnson *et al.* 2013). A transição evolutiva entre predador (vespas) e herbívoros (abelhas), pode ter sido facilitado pelo comportamento de pequenas vespas predadoras de tripes, visitando flores e se alimentando de pólen (Sann *et al.* 2018), juntamente com a irradiação das angiospermas, durante o Cretáceo Inferior ((CI: 148–108 Ma.) (Grimaldi 1999, 2005, Engel 2001, Peters *et al.* 2017).

O grupo mais estudado entre as famílias de abelhas são as abelhas corbiculadas (modificação morfológica com tíbias mais largas em formato de concha) e com pelos plumosos, frequentemente usados na coleta e transporte de pólen e têm aproximadamente mil espécies descritas (Apoidea, Michener 2007, Seeley 1995, Branstetter *et al.* 2017). Dentre elas existem quatro tribos monofiléticas: os Apini (abelhas melíferas ou abelhas de mel) e Meliponini (abelhas sem ferrão) altamente eussociais, os Bombini primitivamente eussociais (abelhas

Bombus) e Euglossini (abelhas das orquídeas), maior parte solitárias, facultativamente comunais e fracamente sociais (Michener 1974).

Diferente de outras abelhas eusociais, com pouca diversidade morfológica e comportamental (Apidae, Apini: 11 espécies; Michener 2007), a tribo Meliponini é considerada o maior grupo monofilético dentre as abelhas sociais. É composto por mais de 500 espécies, em 61 gêneros (Camargo & Pedro 2008, Rasmussen & Cameron 2007). Essa diversidade em abelhas sem ferrão (Meliponini) se estende para os aspectos morfológicos e comportamentais, com populações de dezenas a milhares de indivíduos, diferentes estratégias de defesa e forrageamento, tamanho corporal de 1.8 a 3.5mm de comprimento e associações com outras espécies (Michener 1974, Sakagami 1982, Johnson 1983, Wille 1983, Nogueira-Neto 1997, Batista 2003, Roubik 2006, Barth *et al.* 2008). Seus representantes são encontrados em regiões tropicais e subtropicais, até 30° de latitude norte e sul (Sakagami 1982, Roubik 1989, Camargo 2002). No cerrado cerca de 60% a 75% das espécies vegetais são polinizadas por meliponíneos (Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger 1998), tendo grande importância na polinização de espécies nativas e manutenção do ecossistema (Kerr *et al.* 1996).

Este grupo utiliza recursos extraídos do ambiente e os armazena dentro do ninho. Esses recursos são reservas essenciais para manutenção da colônia, como alimento (pólen e néctar) para adultos e larvas, materiais de construção do ninho, bem como a própria cavidade em que o ninho se encontra (Butler & Free 1952, Roubik 1989, Grosso & Bego 2002, Braga *et al.* 2012). A estocagem destes elementos torna as colônias alvos frequentes de roubo por outros animais, como abelhas parasitas/cleptoparasitas, ursos e macacos (Roubik 1989, Morse & Nowogrodzki 1990).

Abelhas da tribo Apini e algumas espécies de abelhas solitárias comumente defendem seus ninhos ou colônias de maneira ativa, ferroadando a ameaça e marcando-a com feromônios de alarme, recrutando companheiras de ninho para atuarem na defesa (Seeley 1982, Michener 2007). Em *Apis mellifera* é observado que o ferrão permanece preso, devido a presença de ganchos opostos, além disso sua glândula de veneno anexada ao ferrão continua (contraíndo) injetando veneno ao intruso (Michener 2007). Apesar do nome popular, as abelhas-sem-ferrão (Meliponini) possuem a estrutura relacionada ao ferrão atrofiado/vestigial, então não é utilizado para defesa (Costa *et al.* 2003). No entanto os Meliponini apresentam muitas outras estratégias adaptativas e organizacionais de proteção (Michener 1974, 2007, Roubik 1989). Seus ninhos frequentemente têm estruturas que funcionam como defesa passiva, incluindo falsas entradas, labirintos e até mesmo depósitos de resina na entrada do ninho (Portugal-Araújo 1978,

Sakagami *et al.* 1982, Wille 1983). Utilizam outras estratégias de defesa ativa, seja mordendo, usando feromônios de alarme, liberando secreções causticas (i.e., *Oxytrigona tataira*), fechando a entrada do ninho, utilizando a resina como material de imobilização (Butler & Free 1952; Michener 1974; Wille 1983; Johnson *et al.* 1985; Seeley 1982), ou utilizam de uma combinação destes mecanismos de defesa.

O polietismo morfológico das operárias (também utilizado como “altamente eussocial”) é outra forma de alocação de tarefas e está presente em muitas espécies de formigas e cupins (Oster & Wilson 1978). Este aspecto biológico e comportamental é encontrado, por exemplo, em formigas cortadeiras, como nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, onde a rainha é a única casta reprodutora e as operárias são estéreis, categorizadas em subcastas morfológicas intimamente integradas a divisão de trabalho (Wilson & Hölldobler 2005). Embora comum nestes grupos (formigas e cupins), a diferenciação física/morfológica de castas em abelhas eussociais é rara e desconhecida em vespas (Hölldobler & Wilson 2009, Grüter *et al.* 2012). Entretanto, Grüter *et al.* (2017) relatam a produção de soldados/guardas (subcasta para proteção com diferenciação morfológica, ou seja, neste caso são abelhas responsáveis pela defesa que diferem em tamanho e/ou forma das outras operárias) em dez espécies da tribo Meliponini. As quais as guardas encontradas na entrada da colônia são maiores do que suas companheiras de ninho, mas não manifestam adaptações defensivas explícitas, portanto necessitam de estudos comportamentais detalhados (Bourke 2011, Wilson 1953).

1.1. Modelo de estudo

Popularmente conhecida como Jataí, *Tetragonisca angustula* (Latreille 1811) (Hymenoptera, Meliponini), é uma das abelhas sem ferrão mais comuns na América Latina (Batista 2003) e a polinizadora nativa mais eficiente da flora nas Américas do Sul e Central, sendo forrageiras generalistas (Oliveira *et al.* 2004, McCabe & Farina 2010, Braga *et al.* 2012). É encontrada desde o sul do México até a Argentina, mas não é observada na Cordilheira dos Andes, na caatinga do nordeste Brasileiro e em algumas regiões da Amazônia (Oliveira *et al.* 2004). Seus aspectos biológicos, morfológicos e bioquímicos têm sido estudados desde o começo do século XX. Em ambiente natural, as colônias podem ter aproximadamente 10.000 indivíduos quando em condição ideal (van Veen & Sommeijer 2000). Têm operárias relativamente pequenas (comprimento: 4–5 mm), com tempo de vida curto em relação às outras espécies de abelha sem ferrão (em Grosso & Bego 2002, a média de tempo de vida é ~20 dias;

~3% sobreviveram por 40 dias) e de coloração amarelada com partes do corpo em marrom pardo (Wittmann 1985).

O tubo de entrada das colônias desta espécie é construído pelas operárias com cera, em formato cilíndrico, e perfurado com centenas de pequenos furos, supostamente para permitir a troca gasosa (Kärcher & Ratnieks 2009, Wittmann 1985). Quando em caixa racional, é construído em acesso perfurado e é semelhante a entrada das colônias naturais. O tubo geralmente tem ~ 3 cm de comprimento (com exceções) e 1 cm de largura com uma abertura circular na ponta ($d \approx 6\text{mm}$, Couvillon *et al.* 2008). Segundo Couvillon *et al.* (2008) existe correlação entre o comprimento do tubo e o número de operárias pousadas na superfície externa. O número de indivíduos dentro do tubo de entrada altera-se de acordo com o diâmetro da luz do tubo (~ 3,9 vezes mais larga que o tórax de uma operária) e comumente são encontradas entre duas a cinco abelhas (Kärcher & Ratnieks 2009; Couvillon *et al.* 2008) permitindo espaço suficiente para uma única forrageira passar. As forrageiras, ao retornarem, pousam na borda do tubo de entrada antes de entrar, proporcionando uma oportunidade para as guardas fixas, internas e externas, fazer contato físico. À noite, a ponta do tubo de entrada é frequentemente fechada com cera, presumivelmente para impedir a entrada de formigas ou outros insetos (Kärcher & Ratnieks 2009, Couvillon *et al.* 2008).

Estes indivíduos que ficam próximos ou pousados na entrada da colônia e são responsáveis por aceitar as companheiras de ninho e deter os intrusos (Butler e Free 1952, Wittmann 1985, Suka e Inoue, 1993). A defesa realizada por guardas na entrada de ninhos de alguns insetos sociais auxilia na proteção dos recursos estocados (Wilson 1968, Wilson & Hölldobler 2005). A produção de guardas promove melhor desempenho na proteção da colônia, o que, conseqüentemente, aumenta a probabilidade de sua sobrevivência (Giron *et al.* 2007, Powell 2009, Grüter *et al.* 2012, Kamiya & Poulin 2013). O primeiro desafio destes indivíduos é reconhecer se as abelhas que chegam representam uma ameaça, especialmente se estes são visualmente menos discerníveis (Couvillon *et al.* 2009).

Dentre as espécies estudadas por Grüter *et al.* (2017) *T. angustula* é a espécie de abelha que apresenta a diferenciação de tamanho mais pronunciada (polietismo morfológico), possibilitando uma distinção bimodal das subcastas em forrageiras e guardas (Grüter *et al.* 2017). Nesta espécie, as guardas representam 1- 6% da população da colônia, são maiores, mais pesadas (30%) e com formato corporal diferente das forrageiras (Fig. 2) (Grüter *et al.* 2012; Segers *et al.* 2015, Hammel *et al.* 2016). Têm pernas traseiras relativamente maiores para seu o peso corporal, mas uma cabeça menor que as forrageiras (Grüter *et al.* 2012). O tórax das

forrageiras é geralmente coberto por uma fina camada de resina (Fig. 1), já as guardas têm resina nas pernas, mas não no tórax (Jones *et al.* 2012). Conforme estudado por Grüter *et al.* (2012) em *T. angustula*, as guardas maiores são mais eficientes e resistem por mais tempo em batalhas contra os intrusos testados e as pernas maiores podem ainda auxiliar a segurá-los (Grüter *et al.* 2012).

Figura 1. Diferença morfológica entre forrageira (esquerda) e guarda (direita) de *T. angustula*. Barra referente a 1mm

Além do polietismo morfológico, em *T. angustula* há dois tipos distintos de abelhas guardas (Figura 2), as guardas fixas de entrada (GF), que permanecem pousadas no tubo de entrada do ninho sem voar e um segundo tipo, conhecido somente para esta espécie, que pairam próximo a esta entrada, sem entrar na colônia como as forrageiras, denominadas guardas voadoras (GV) (Wittmann 1985, Kärcher & Ratnieks 2009, Grüter *et al.* 2011). A maioria das guardas voadoras (“grupo principal”; segundo Kärcher & Ratnieks 2009) paira a 20 cm da entrada (Wittmann 1985) de frente a luz do tubo de entrada (Wittmann 1985, Wittmann *et al.* 1990, Kelber & Zeil 1997). Poucas guardas pairam de 20 a 50 cm do tubo de entrada, para direita ou esquerda (“grupos laterais” segundo Kärcher & Ratnieks 2009).

Alguns estudos observaram respostas agressivas/defensivas de abelhas quando expostas a respiração de vertebrados (i.e. DeGrandi-Hoffman *et al.* 1998). Kärcher & Ratnieks (2009) investigaram o comportamento de defesa de *T. angustula* para este tipo de estímulo (simulado por respiração humana próxima a entrada do ninho) e constataram que a reação geralmente é o recolhimento dos indivíduos guarda para o interior do ninho, consequente diminuição do número de guardas fixas na entrada do ninho.

Durante o processo de defesa, as guardas voadoras (GV) atacam os intrusos que se aproximam, principalmente aqueles com cores distintas (muitas abelhas ladras são pretas) das forrageiras ou que exalam forte odor (Bowden *et al.* 1994, Wittmann *et al.* 1990), forçando os intrusos para o chão, agarrando as pernas e asas com as mandíbulas (Wittman 1985, Bowden *et al.* 1994). Entretanto, Bowden *et al.* (1994), descreve que estas GV não detectam intrusos da mesma espécie (Bowden *et al.* 1994). Estes intrusos então, são detectados pelas GF, pousadas no tubo de entrada (Jones *et al.* 2012; Kärcher & Ratnieks 2009), através do reconhecimento de moléculas voláteis e não voláteis presentes na cutícula, que necessita de contato dos quimiorreceptores localizados nas antenas (Van Zweden & D'Ettorre 2010).

Figura 2. Guardas fixas (pousadas no tubo de entrada e em seu entorno) e guardas voadoras (pairando próximo a entrada) de *Tetragonisca angustula*.

Os processos de reconhecimento e comunicação entre espécies na maioria das vezes é mediado por pistas químicas (Jones *et al.* 1971, Lewis *et al.* 1976, Ehrlich e Raven 1964, Chapman 2013, pg 772). As antenas têm alta concentração de diferentes tipos de sensilas (pelos, cerdas) envolvidas na percepção de estímulos externos (Chapman 2013, pg 776). As sensilas placóides são quimiorreceptores (Snodgrass 1956, Shanbhag *et al.* 1999) e seu papel no olfato já foi demonstrado em abelhas (Spaethe *et al.* 2007, Riveros & Gronenberg 2010). *Tetragonisca angustula* apresenta sensilas placóide e tricóide em todos os segmentos da antena (antenômeros), as sensilas coelocônica e campaniforme são encontradas no segmento 9 (IX), já as basicônicas estão restritas ao décimo (X) segmento (Fialho *et al.* 2014). A sensila placóide é uma placa oval com sulcos arredondados (Figura 3), sua superfície é levemente rebaixada, formando algo similar com uma cratera suave e oval (Fialho *et al.* 2014).

Figura 3. Micrografia eletrônica das sensilas antenais de abelhas. A) Sensila Placóide (PL). B) PL + Sensila Tricóide (TR) (Modificado de Fialho *et al.* 2014).

O tamanho corporal é uma variável determinante de percepção sensorial (Chittka & Niven 2009, Spaethe *et al.* 2007) em que indivíduos maiores podem acomodar um número maior de placas com sensilas antenais (ex. Gill 2013), órgão responsável pela captação de estímulos químicos provenientes do ambiente (Chapman 2013), assim o tamanho corporal pode influenciar na eficiência de reconhecimento entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies distintas.

Portanto, estes sinais interespecíficos servem de instrumento de manipulação, promovendo uma corrida armamentista entre resistência e persuasão, predador presa, emissor e receptor (Krebs & Davies 1996), referindo ao processo de coevolução. Remetendo a uma adaptação em resposta a espécies predadoras, engatilhada pela detecção do feromônio de agregação do predador, o caso demonstrado por Grüter *et al.* (2017) sugere que o aparecimento de guardas (subcasta para proteção com diferenciação morfológica) durante a evolução das espécies de Meliponini estudados, pode estar associado a coexistência com abelhas parasita social obrigatórias (*Lestrimelitta limao*), sendo esta a força motriz para seleção de novas subcastas e provável aumento da complexidade social (Grüter *et al.* 2017).

Além dos saqueadores, como a abelha limão (*Lestrimelitta limao*), e dos insetos parasitas, como os forídeos (*Pseudohypocera kerteszi*), outros invertebrados podem ser uma ameaça à colônia (Nogueira-Neto 1997). Ainda são escassos os estudos sobre complementação intranidal na defesa e uma das lacunas remanescentes sobre os mecanismos de defesa desta subcasta em *T. angustula* é (i) quais pistas e mecanismos de reconhecimento de intrusos são utilizadas pelas guardas voadoras e fixas, e (ii) como os dois grupos de guardas interagem quando ameaçados.

2. OBJETIVO

Este estudo almejou compreender as estratégias de defesa da abelha *Tetragonisca angustula* expondo as guardas à diferentes espécies intrusas, (i) a abelha *Lestrimelitta limao*, um inimigo natural da espécie estudada, e (ii) outras espécies classificadas como neutras ou que oferecem uma possível ameaça para as colônias. Além disso, este estudo buscou compreender o papel dos dois fenótipos comportamentais das guardas (as voadoras e as fixas) na estratégia de defesa da abelha em questão

2.1. Objetivos específicos

Exp. 1. Tipo de intrusos e modo de apresentação:

- Verificar a influência do tipo de isca e o modo de apresentação na resposta comportamental das guardas.
- Quantificar o número de guardas, na entrada a colônia, antes e depois da apresentação dos intrusos.
- Descrever os comportamentos exibidos pelas guardas quando expostas aos intrusos.
- Comparar a resposta comportamental das guardas em relação a presença de diferentes intrusos, sendo eles, (i) a abelha *Lestrimelitta limao*, um inimigo natural da espécie estudada, e (ii) outras espécies classificadas como neutras ou que oferecem uma possível ameaça para as colônias.

Exp. 2. Capacidade sensorial

- Medir o tamanho da cápsula cefálica da primeira guarda a atacar o intruso.
- Determinar o tamanho médio das guardas para cada colônia experimental.
- Determinar o tamanho das colônias através da metodologia de contagem de forrageiras, segundo a metodologia.
- Quantificar a densidade de sensilas odorífera (placóide) nas antenas de guardas de diferentes tamanhos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de estudo, Período dos Testes e Bioensaio

O estudo foi realizado com oito colônias em caixas racionais presentes no meliponário e nas dependências do Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais (LABCEIS), Departamento de Biologia da Universidade de São Paulo (21°9,4 S, 047°51,3W - Ribeirão Preto, SP), Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (Figura 4).

Figura 4. Mapa de localização/posição das colônias de *T. angustula* (pontos) utilizadas no experimento. (B7) Bloco 7, (B8) Bloco 8, (B9) Bloco 9 da FFCLRP.

Em via de verificar o melhor horário para realização dos testes comportamentais as observações foram feitas de hora em hora iniciando às 08:30h (início da vigia) e finalizando às 18:00h. Do mesmo modo, durante os experimentos de manipulação, contamos o número de guardas inicial para constatar a padronização desta quantidade no decorrer do tempo.

Os testes pilotos e adequação da metodologia ocorreram entre setembro de 2016 e fevereiro de 2017. Os experimentos foram realizados durante os anos de 2017 (março, abril, setembro a dezembro) e 2018 (Janeiro, Fevereiro), em dias ensolarados (média de 31,08°C, umidade 47%) com o forrageamento ativo das operárias. Em ambos os períodos foram

utilizadas as mesmas colônias, com a estabilidade de atividades acompanhada. As colônias previamente selecionadas que apresentaram redução da atividade de forrageamento ou o número de guardas (três colônias) foram removidas dos experimentos. As colônias mantidas nos testes (7) foram padronizadas pela frequência média de guardas na entrada da colônia verificadas antes de cada experimento.

Dentre as sete colônias selecionadas para o estudo, três colônias foram mantidas dentro do laboratório para observação interna. O acesso externo da colônia ao ambiente ocorria por tubo plástico transparente de 30 cm. Quatro colônias estavam no meliponário previamente, em estantes de madeira (~ 1,5m do chão). Todas as colônias estavam em um ambiente de alta densidade populacional ($38,25 \pm 3,05$ colônias, raio de 5 metros) de ninhos de abelhas sem ferrão (~ 10 espécies diferentes).

Para apresentação das iscas, utilizamos uma haste flexível (antena) acoplada a um tripé leve e estável (Figura 2), facilitando o transporte no local do estudo. Os indivíduos isca foram colados em papel filtro com supercola, deixando o movimento dos apêndices livre. Este papel foi cortado no padrão 1 cm por 4 cm, com a ponta distal reduzida a 0,2cm por 0,5cm, possibilitando sua colagem no dorso das iscas e encaixe no final da haste (Figura 5).

Os testes foram realizados em sequência aleatória entre as colônias, respeitando o mínimo de uma hora entre experimentos para a mesma colônia. A aproximação foi realizada de cima para baixo ou lateralmente, de modo aleatório, conforme a mobilidade do tripé utilizado, conservando a distância de 3 a 5 cm entre a isca e o tubo de entrada (Figura 6) (adaptado de van Zweden *et al.* 2011). Entre uma colônia e outra, quando o indivíduo isca era tocado ou atacado o mesmo era substituído por um novo, evitando assim que as guardas “marcassem” aquele indivíduo com compostos de agressão ou fuga de uma colônia para outra. O experimento controle foi realizado com o papel filtro e supercola (Tekbondor), igualmente aos indivíduos isca, para verificar sua neutralidade nas respostas das guardas.

Figura 5. Colagem e fixação de ameaças (*Scaptotrigona* aff. *depilis*) em antena extensível. A). Local padrão de colagem no dorso da isca, mantendo os apêndices locomotores livres; B) Conjunto de suportes; C) Modo de inserção do suporte na abertura distal da haste; D) Isca colada/fixada a um suporte já dobrado; E) Modelo de corte e dobradura (linha descontinua) do papel filtro (suporte); F) vista lateral de isca pronta para apresentação; G) Vista frontal de isca pronta para apresentação.

Figura 6. Modelo do movimento da haste para apresentação da isca próximo a entrada das colônias de *Tetragonisca angustula*.

3.2. Registro e contagem das guardas

Tendo em vista que as caixas e/ou paredes, onde as colônias se encontravam, eram de cores similares ao tubo de entrada e também a cor dos indivíduos, restringindo consideravelmente a nitidez para observação dos comportamentos e contagem de guarda, adicionamos um fundo de cor padrão (preto) logo atrás da entrada da colônia, com tamanho 25x25cm de papel cartão e perfuração central para encaixe do tubo de entrada sem danificá-lo (Fig. 7). O papel cartão foi colocado durante a noite e fixado com fita crepe nas laterais da caixa ou parede. Esperamos duas semanas para garantir a normalização das atividades das colônias.

Figura 7. Exemplo comparativo de imagem para a contagem de guardas voadoras de *T. angustula*, setas mostrando o posicionamento das abelhas (A). Imagem após a fixação do papel cartão, setas mostrando as abelhas.

Os registros foram realizados a uma distância mínima de 1 metro da colônia, reduzindo a influência da presença do observador e da filmadora, na resposta das guardas frente às iscas. Utilizamos uma *Video filmadora Panasonic Ag Ac8 de Alta Definição* com zoom aplicado até que a área enquadrada fosse semelhante para todas as colônias. O número de GF e GV foi contado no momento do teste e reconfirmado através das análises dos vídeos. Cada teste teve a duração de aproximadamente cinco minutos. Para os testes estatísticos utilizamos o número de guardas Fixas (GF) e Voadoras (GV) contados nos tempos antes e depois da apresentação das iscas às colônias (Tabela 1).

Tabela 1. Esquemas de contagem e observação dos comportamentos das guardas de *T. angustula*.

Tempo	Descrição
Antes	Para registrar a atividade natural da colônia para cada teste realizamos 1 minuto de filmagem antes da apresentação da ameaça, esta exposição inicial pode também diminuir a influência do observador e da câmera nas respostas seguintes. O número de guardas foi contado pouco antes da apresentação da isca.
Durante	Observação e registro de comportamentos relacionados a presença da isca, com apresentação por 1 minuto continuamente. Notamos em testes preliminares que 1 minuto era suficiente para observarmos respostas (quando se aplica).
Depois	Imediatamente após a remoção da isca o número de guardas foi contado. Continuamos a filmagem por mais 2 minutos.

3.2.1. Comportamentos

Os comportamentos apresentados pelas GF e GV, em resposta a apresentação da isca, foram registrados no momento do teste em uma planilha, e posteriormente verificados com auxílio dos vídeos. Assim, foi possível observar se os dois tipos de guardas se comportavam de acordo com a isca ou modo de apresentação (Tabela 1).

3.2.2. Latência de ataques

Os tempos médios de ataques para as espécies intrusas foram mensurados a partir dos registros em vídeo, cronometrado a partir do início da apresentação da isca até o momento da ocorrência do ataque.

3.3. Apresentação das iscas

Para possibilitar a aderência da cola do suporte no intruso, seguimos o seguinte protocolo: entorpecimento por meio de refrigeração (freezer a 5°C) ou uso de CO₂ em pote fechado (apenas aranhas), o tempo de exposição para paralização de movimentos foi relativo a espécie e tamanho dos indivíduos. Em todos os casos, as iscas utilizadas reativaram os movimentos com sucesso. Após os procedimentos, os espécimes foram incorporados à coleção de insetos do LABCEIS.

As espécies coletadas durante a noite (*Atta sexdens*, *Acromyrmex subterraneus*, *Camponotus* sp.) foram mantidas em potes plásticos com água açucarada embebida em algodão até o dia seguinte para utilização nos bioensaios. A integridade dos indivíduos foi verificada antes do procedimento padrão de preparo para apresentação (imobilização por refrigeração, colagem no suporte de papel filtro e reaquecimento).

3.3.1. Modos de apresentação das iscas

Caminhando

Este modo de apresentação foi realizado para todas as espécies utilizadas como isca, assim como controle. O tripé foi posicionado lateralmente na entrada da colônia, próximo ao substrato (encostada na caixa/papel preto). A aproximação iniciou de cima para baixo, por limitações no movimento do tripé, simulando o comportamento do indivíduo ao caminhar, respeitando a distância de 3 a 5 cm do tubo de entrada na posição final da isca.

Voando

Este modo de apresentação foi utilizado apenas para as espécies aladas e controle, lembrando que estas também foram submetidas ao modelo anterior. O tripé foi posicionado em frente à entrada da colônia, não centralizado. O direcionamento da aproximação foi fronto/diagonalmente a luz do tubo de entrada (também iniciado de cima para baixo, idem), de modo a obstruir a visão das GF ou a passagem das forrageiras que saíam ou entrava na colônia, simulando a forma de aproximação natural de um indivíduo voando, respeitando o limite de 3 a 5 cm na posição final da isca.

3.3.2. Espécies-isca

As espécies utilizadas como iscas foram selecionadas com base em vários critérios, com exceção do controle.

- Indivíduos Ápteros e Alados relacionado ao modo de apresentação, avaliando se existe resposta distinta entre os tipos comportamentais de guardas (GF e GV).
- Cores, morfologias e odores distintos ou similares dos indivíduos de *T. angustula*, buscando entender melhor as pistas utilizadas para reconhecimento entre GF e GV.
- O potencial de predação, examinando a habilidade de reconhecimento de ameaças ou intrusos inofensivos. Sendo baixo (*Acromyrmex subterraneus*, *Trachypus buharti*), intermediário (*Atta sexdens* e *Scaptotrigona aff. depilis*) e alto (*Menemerus* sp. (aranha), *Camponotus* sp. (formiga açucareira) e *Lestrimelitta limao* (abelha parasita obrigatória (cleptobiótica/pilhadora))).

Lestrimelitta limao, por ser uma abelha pilhadora obrigatória (Grüter *et al.* 2016), *Scaptotrigona aff. depilis*, por ser uma abelha comum no local de realização dos testes, conhecida por ser oportunista em usurpar outras colônias de abelhas sem ferrão (Michener 1974), a vespa *Trachypus boharti* (Hymenoptera, Cabronidae), por serem predadoras de machos de abelhas do gênero *Scaptotrigona* em voo (Koedam, *et al.* 2009; 2010). Para iscas ápteras utilizamos aranhas do gênero *Menemerus*, como *Menemerus bivittatus* (Dufour 1831), pois são comumente encontradas predando abelhas sem ferrão (Penney & Gabriel 2009), a formiga *Atta sexdens* e *Acromyrmex subterraneus*, tendo que não representam ameaça a colônia, pois se alimentam de fungos cultivados na colônia e seiva de folhas coletadas (Hölldobler & Wilson 2009). Uma característica de *A. sexdens* é a presença do composto isômero do citral (utilizado como substância defensiva para a própria espécie e também como cairomônio pelas guardas de *T. angustula* (Wittmann 1990) em sua glândula mandibular (Yem & Chung 2015), assim observamos se a morfologia do indivíduo apresentado tem influência nas respostas das guardas. Utilizamos também uma espécie do gênero *Camponotus*, conhecida por ser atraída a fontes de açúcar, podendo representando uma ameaça a reserva de mel nas colônias de *T. angustula* (Marcolino *et al.* 2000).

Acromyrmex subterraneus

A espécie *Acromyrmex subterraneus* foi considerada inofensiva, para as guardas de *T. angustula*, pois sua alimentação é baseada em uma espécie de fungo cultivado dentro da colônia e seiva de folhas coletadas em campo (Wilson & Hölldobler 2005). A coleta foi realizada

durante o anoitecer (~ 19:00h) com pinça maleável, de maneira delicada, reduzindo possíveis danos, em trilhas de forrageamento, nas proximidades do LABCEIS e mantidas em pequenos potes de vidro até a transferência para os potes plástico com alimento.

Atta sexdens

Atta sexdens é popularmente chamada como “saúva-limão”, pois quando sua capsula cefálica é esmagada libera forte odor de limão (Blum *et al.* 1966). É uma espécie altamente polimórfica, ou seja, as operárias têm grande variação de tamanhos e morfologia (Hölldobler & Wilson, 1990, p. 325), divididos em 4 subcastas de acordo com a divisão de tarefas: jardineiras/cuidadoras, generalistas internas, forrageiras e soldados (Wilson 1980).

Em nosso estudo utilizamos soldadas e a forrageiras maiores (cabeça entre 2,2-4,8 mm). Tem a composição majoritária do isômero citral (~55,8% geraniale e ~28,5% de neral), somando cerca de 90% do total (Francelino 2006, Do Nascimento *et al.* 1993) presente na glândula mandibular (40 µg/cabeça, conforme Schildknecht 1976). Quando secretado provoca resposta de alarme similar a 4-methyl-3-heptanone, conhecido como feromônio de alarme para outras espécies de *Atta* (Della Lucia *et al.* 2001, Francelino 2006). Como mencionado antes, este composto é utilizado como cairomônio pelas guardas de *T. angustula* provocando intensa resposta defensiva (Wittmann *et al.* 1990). A colagem dos espécimes no suporte foi realizada na frente da cabeça, pois os indivíduos têm a parte dorsal do tórax ornamentado por espinhos (Fig. 8).

Figura 8. Local referente a melhor aderência do suporte para espécies isca; A) *Atta sexdens* fixada a frente da capsula encefálica; B) *Menemerus* sp. fixação em parte ventral do prossoma e opistossoma C) *Camponotus* sp. fixado a face dorsal do gaster.

Figura 9. Espécimes do gênero *Camponotus* utilizado nos testes. A e D) forrageira, em vista lateral; B, C, E) Guarda vistas dorsal, frontal e lateral, respectivamente.

Camponotus sp.

As espécies deste gênero são frequentemente encontradas em ambiente urbano (Oliveira *et al.* 2017) e se alimentam de substâncias açucaradas (Baccaro *et al.* 2015, Silva *et al.* 2005). O estoque de mel (néctar desidratado) de *T. angustula* e de outras espécies pode ser atrativo para consumo por estas formigas (Marcolino *et al.* 2000). Os indivíduos foram coletados dentro do laboratório durante o forrageamento na noite anterior (~ as 20:00h) ao teste. A colagem foi realizada na parte ventral do abdômen e cabeça pequena (Fig. 9).

Lestrimelitta limao

Abelhas da espécie *Lestrimelitta limao* (Smith, 1863) foram coletadas próximo ao Departamento de Genética, campus da USP de Ribeirão Preto a aproximadamente 600 metros de distância do local de realização dos testes, separados por uma pequena represa (50 m de largura, no trecho próximo a menor distância entre os pontos de coleta e testes). Coletamos de apenas uma colônia os indivíduos presentes no tubo de entrada com “aspirador/ sugador manual” e transferidos para um pote único. Pouco antes do início dos testes individualizamos em potes de vidro e cada abelha foi refrigerada separadamente e então colada.

Menemerus sp.

Observamos no local de estudo grande quantidade de aranhas soltadoras do gênero *Menemerus* Simon, 1868 (conhecidas como “gray wall jumping spider”, *Menemerus* sp., Salticidae; Figura 10) próximas aos tubos de entrada de colônias de abelhas sem ferrão ou a ninho de abelhas solitárias presentes no entorno do LABCEIS. Penney & Gabriel (2009) relata a espécie *Menemerus bivittatus* (Dufour 1831) predando abelhas sem ferrão, e o registro do comportamento anterior a predação, indivíduo direcionado ao tubo de entrada acompanhando as abelhas entrarem e saírem, não há registro de outra espécie de Salticidae fazendo o mesmo (Penney & Gabriel 2009).

Os indivíduos foram coletados nas paredes dos laboratórios próximos ao meliponário. Utilizamos potes de vidro com tampa plástica para armazenar os indivíduos após coleta com pinça maleável (evitando dano físico). A imobilização foi realizada através da exposição a CO₂ por ~20 segundos. A colagem foi feita na parte ventral do prossoma e opistossoma, pois quando colado apenas no opistossoma o indivíduo girava o prossoma para o lado inverso, deixando-o inerte (imóvel), a colagem em ambas as partes evitava este movimento, porém permitia a movimentação das pernas (Figura 10).

Scaptotrigona aff. depilis

Scaptotrigona aff. depilis é considerada uma espécie agressiva a humanos, conhecida como “torce-cabelo” (Nogueira-neto 1997), seus ninhos são frequentemente encontrados (levantamento de 133 ninhos no *campus* da USP-RP (Dias 2011) e podem ter colônias populosas de até 50.000 indivíduos (Nogueira-Neto 1997).

Esta espécie pode ser considerada parasita social facultativa, ou seja, é oportunista (rouba recurso de outras colônias de abelhas sem ferrão “fracas”, Michener 1974), utiliza as trilhas de cheiro e marcação de fonte já visitadas por outras espécies (Schmidt *et al.* 2003). Foi apresentada nos bioensaios como uma ameaça intermediária. O comportamento relatado não foi observado durante o tempo de realização dos experimentos. Apesar da morfologia similar a *L. limao* e mesma cor, esta abelha tem odor diferente (Fig. 11).

Os indivíduos de *S. aff. depilis* foram coletados de apenas uma colônia. Seleccionamos indivíduos que saíam da colônia, com pequeno pote de vidro segurado em frente o tubo de entrada por alguns segundos e então tampado. As coletas foram realizadas poucos minutos antes dos testes, passando pelo processo de resfriamento, colagem e reaquecimento.

Trachypus buharti

Trachypus boharti Rubio-Espina (Hymenoptera, Cabronidae), é uma vespa conhecida por ser predadora especializada na captura de machos de *Scaptotrigona* sp., com capacidade de distinção entre machos e operárias através do reconhecimento dos hidrocarbonetos cuticulares (Giannotti & Pinto 2001, Koedam *et al.* 2009, 2010). É de cor amarela e marrom pardo, três vezes o tamanho de operárias de *T. angustula* (Fig. 12). Os machos de *Scaptotrigona* sp. se concentram em grande quantidade voando em frente as colônias ou pousados em agregados (Vollet-Neto *et al.* 2017) e as vespas forrageiam voando entre os machos e os capturando no ar.

Portanto, os indivíduos foram coletados durante seu forrageamento com auxílio de puçá (haste com aro coberto de tecido voil), poucos minutos antes dos testes e então refrigerados, colados (tórax) e reaquecidos (30 min.) de modo padrão. Mesmo sendo predadora esta espécie foi considerada inofensiva por sua especialização de presa.

Figura 10. A, B) Espécimes do gênero *Menemerus* utilizados nos testes; C) Indivíduos coletados e mantidos separadamente em potes de vidro.

Figura 11. Indivíduos de *Scaptotrigona* aff. *depilis* utilizados nos bioensaios, provenientes de uma única colônia.

Figura 12. Espécime de *Trachipus boharti* em vista lateral/dorsal (A) e lateral/frontal (B).

3.4. Relação tamanho corporal e capacidade de reconhecimento

Testamos se o tamanho do guarda prevê a agressão contra um intruso heteroespecífico que não é uma ameaça a colônia. A espécie *Friseomelitta varia* foi selecionada pois não é conhecida por roubar colônias de *T. angustula* (Grüter *et al.* 2016), além disso, é diferente em cor, tamanho e perfil químico (Nunes *et al.* 2008, Balbuena *et al.* 2018), assim os guardas de *T. angustula* poderiam usar pistas visuais e quimio-sensoriais para reconhecimento. *T. angustula* é ligeiramente menor (largura da cabeça 1,8 mm vs. 2,3 mm) e de coloração mais clara que a *F. varia* (Grüter *et al.* 2017). As colônias destas espécies são comuns na área de estudo (Freitas 2001) e contêm de algumas centenas a alguns milhares de operárias (van Veen e Sommeijer 2000, Tóth *et al.* 2004).

Figura 13. Mapa das colônias selecionadas para uso nos testes de reconhecimento, pontos vermelhos *Tetragonisca angustula*, ponto amarelos *Friseomelitta varia*.

3.4.1. Local de estudo

As colônias de *Tetragonisca angustula* e *Frieseomelitta varia* estavam na Universidade de São Paulo (21 ° 9,4 S, 047 ° 51,3 W - Ribeirão Preto, SP. Seleccionamos colônias próximas ao Departamento de Biologia da FFCL-RP, cerca de 260 metros do LABCEIS com nidificação na parede do edifício (abaixo de 1 metro de altura do chão) e ninhos em caixas racionais no meliponário (Fig. 13), as entradas estavam entre 0,20 e um metro do chão. Essas localidades foram escolhidas para verificarmos se as colônias situadas longe do meliponário teriam guardas maiores, devido menor competição por recursos no ambiente como relatado por Segers *et al.* (2016).

3.4.2. Reconhecimento

Para investigar o reconhecimento de heteroespecíficos, foram utilizadas 10 colônias de *T. angustula* nos locais descritos anteriormente. Utilizamos indivíduos que saíam da colônia de *F. varia*, provavelmente forrageiras. Nós tentamos apresentar uma abelha de uma determinada colônia *F. varia* em cada uma das colônias de *T. angustula*, mas devido a menor quantidade de colônias de *F. varia* isso nem sempre foi possível (N = 99, 8-11 introduções por colônia de *T. angustula*).

Para evitar possíveis influências na capacidade de reconhecimento, por temperatura e horário de apresentação nas respostas exibidas pelas guardas, testamos todas as colônias de Jataí com intrusos da mesma origem no mesmo dia, conservando aproximadamente 30 minutos entre um teste e outro para a mesma colônia.

Os testes iniciaram coletando 10-15 forrageiras de *F. varia* de uma única colônia. Os indivíduos foram armazenados em potes de vidro (separados por colônia) e colocados imediatamente dentro de uma caixa de isopor com “blocos de gel congelados” até imobilização (10-30 min), mantendo-os anestesiados, mas ainda vivos. Essa metodologia foi utilizada para melhor mobilidade entre as colônias de Jataí durante as apresentações. O número de guardas fixas foi contado antes da aproximação. As forrageiras de *F. varia* foram utilizadas de modo aleatório, anotando-se sua colônia de origem.

O processo de restabelecimento à temperatura ambiente ocorreu ao nos aproximarmos da colônia de *T. angustula* para o experimento, transferindo os indivíduos do pote de vidro para uma placa de Petri plástica. Estudos relatam que elas levam algum tempo até que consigam

voar (Kärcher & Ratnieks 2009, Jones *et al.* 2012, Couvillon *et al.* 2013), o mesmo ocorre, sob condições similares, com indivíduos de Jataí (Jones *et al.* 2012). Tendo em vista que nosso experimento é relacionado a resposta das guardas fixas, esperamos até o momento que ao entrar em contato com um palito de madeira (8 cm de altura e 0,3 cm de largura, palito de dente) o indivíduo de *F. varia* exibisse o reflexo de agarrá-lo, refletindo assim o reaquecimento. Então posicionamos o palito na vertical fazendo com que a abelha caminhasse lentamente para sua extremidade e em sequência o aproximamos ao tubo de entrada da colônia de teste.

Durante as introduções, observamos por dois minutos se ocorreria resposta agressiva, representando rejeição, exibindo ataque, sustentando a mordida (fechar as mandíbulas em alguma parte do corpo do intruso) e atirar-se ao chão junto ao intruso, ou aceitação, quando o indivíduo era apenas antenado rapidamente (1-3 segundos) pelas guardas, mas ignorado, analisamos também se as guardas se afastavam da forrageira de *F. varia* (Kärcher & Ratnieks 2009, Jones *et al.* 2012, Couvillon *et al.* 2013). A primeira guarda que atacou foi recolhida, identificada (com o ninho de origem e com a colônia da abelha introduzida) e armazenada em Eppendorf (1,5 ml, colocados na caixa de isopor) para, posteriormente, estimarmos o tamanho da guarda através da medida da largura de sua capsula cefálica.

3.4.3. Tamanho corporal

Em vias de verificar a relação do tamanho do indivíduo com sua sensibilidade/capacidade para reconhecimento realizamos a medida da largura da cabeça. A variação do tamanho de guarda dentro de uma única colônia é pequena e constante por várias semanas, o que foi suficiente para o estudo (Grüter *et al.* 2012). Os testes descritos acima (aceitação e rejeição) foram realizados antes de iniciar as medidas dos indivíduos coletados, assim o observador não pôde inferir sobre as respostas apresentadas.

Nós capturamos as guardas individualmente, diretamente do tubo de entrada usando uma pinça maleável, os transferimos para tubos Eppendorf de 1,5 ml (identificado com etiqueta, colônia de origem de *F. varia* e colônia de teste de *T. angustula*) e os mantivemos armazenados em freezer de -5°C, evitando a dissecação e consequente redução do tamanho.

Com a contagem do número de placas (sensilla placodea), através de microscópio de luz (ampliação de 1000, segmentos um a sete), investigou-se existe uma ligação entre o tamanho da guarda e o número de sensilas. A área das antenas foi estimada por meio do comprimento e largura dos segmentos de um a nove (Grüter *et al.* 2018).

Ao final dos experimentos coletamos seis guardas fixas de cada colônia para estimar o tamanho médio das guardas por colônia. Utilizamos um estereomicroscópio (Stemmi S V6 – Zeiss), onde o indivíduo foi disposto em papel quadriculado para padronização. Para iniciar as medidas desconectamos a cabeça do tórax delicadamente e a posicionamos com a “face” para cima, então medimos a largura máxima da capsula cefálica (na altura dos olhos compostos no final da junção dos sulcos entre a inserção das antenas, Fig. 14) usando ImageJ 1.46 (modificado de Grüter *et al.* 2012)

Figura 14. Guarda coletado durante teste de reconhecimento, Vista lateral (A), Vista dorsal (B), Medidas de largura máxima entre os olhos e comprimento do final clipeo a junção dos “sulcos” da capsula cefálica (C).

O tamanho relativo da colônia foi verificado contando-se as forrageiras que retornavam por 30 segundos quatro vezes por dia (Segers *et al.* 2016), então a capacidade de reconhecimento das guardas foi correlacionado. O estudo realizado por Segers *et al.* (2016) demonstra que há correlação positiva entre o tamanho da guarda e o número de guardas presentes na entrada da colônia (Segers *et al.* 2016), este fator é também impulsionado pela correlação positiva entre o tamanho da colônia e o número de guarda (Segers *et al.* 2016). Por essa razão, incluímos tanto o tamanho da colônia quanto o tamanho corporal das guardas, como variáveis preditoras em nossos modelos.

3.5. Análises estatísticas

Utilizamos o software R 3.5.2 (R developmental team (2018-12-20)) para a maioria dos testes estatísticos. A flutuação da quantidade de guardas entre os tempos, antes e depois, dos testes foram verificadas através de Modelo Linear Misto (LME) e Modelo Linear Misto Generalizado (GLMM), examinando a influência dos fatores aplicados, intruso específico e modelo de apresentação (Tabela 2). Tal abordagem foi utilizada pelo fato desses modelos controlarem a dependência entre os dados obtidos em cada uma das oito colônias, incluído “colônia” como componente randômico. O componente fixo foram as variáveis explanatórias.

Tabela 2. Distribuição de dados dos tratamentos, relativo as análises utilizadas conforme AICc.

Intrusos	Modo de apresentação	Melhor Distribuição (AICc e Peso)	
		GV	GF
<i>Atta sexdens</i> (formiga cortadeira + citral)	Caminhando	Poisson	Gaussian
<i>Acromyrmex subterraneum</i> , (formiga cort.)	Caminhando	Poisson	Gaussian
<i>Camponotus</i> sp. (formiga açucareira)	Caminhando	Poisson	Gaussian
<i>Menemerus</i> sp. (Aranha saltadora)	Caminhando	Gaussian (Sf)	Gaussian
<i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depiles</i> (abelha preta)	Caminhando	Poisson	Gaussian
<i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depiles</i> (abelha preta)	Voando	Gaussian (Sf)	Gaussian
<i>Lestrimelitta limao</i> (parasita social)	Caminhando	Gaussian	Gaussian
<i>Lestrimelitta limao</i> (parasita social)	Voando	Poisson	Gaussian
<i>Trachipus buharti</i> (Vespa)	Caminhando	Gaussian	Gaussian
<i>Trachipus buharti</i> (Vespa)	Voando	Poisson	Gaussian

Tabela 3. Descrição da Distribuição dos dados e os Modelos estatísticos utilizados para análises. (Sf) singular fit.

Distribuição	Modelo
Poisson	Modelo Misto Linear Generalizado, ajuste por máxima verossimilhança (Aproximação de Laplace) [glmerMod]
Poisson	Tabela de Análise de desvio (Tipo III Wald chisquare tests)
Gaussian	Modelo Misto Linear, ajuste por REML. (Testes –T, usando metodo Satterthwaite's)
Gaussian	Análise tipo II de Variância (Table com método Satterthwaite's)
Gaussian (Sf)	SINGULAR FIT (correspondencia 0 e Singular Fit em Poisson, se usa Gaussian)

O modelo melhor ajustado para análise foi selecionado através da Análise de Variância (ANOVA), considerando o menor valor de Critério de Informação de Akaike (AIC) com correção para amostras pequenas (AICc) e maior peso (Weight). Seguindo o protocolo de probabilidade proposto por Zuur *et al.* (2009). Assim LMEs foram usados para variáveis com distribuição normal (Gaussian); GLMMs foram utilizados para variáveis com distribuição de Poisson (Tabela 3).

3.5.1. Respostas Comportamentais

Os resultados comportamentais obtidos foram analisados sob três maneiras: resposta para cada espécie e descrição de comportamentos exibidos, Porcentagens, comparativa (reação de GV e GF sobre intrusos e modo de apresentação, PCA, SIMPER, ANOSIM). Para padronizar a frequência comportamental entre os testes utilizamos a porcentagem de ocorrência dentro de cada tratamento.

Realizamos a Análise de Componentes Principais (PCA) para detectar uma possível correlação entre as variáveis, com seu carregamento (loadings) atrelado, e complementado com uma análise discriminante SIMPER, para determinar quais foram os comportamentos que mais influenciaram na separação dos grupos. De tal modo o primeiro componente apresentado é responsável pela maior variabilidade nos dados. As pontuações do PCA são calculadas usando produtos vetoriais com os dados originais. Os autovetores e autovalores (componentes principais) de uma matriz de covariância (ou correlação) representam o "núcleo" de um PCA, assim os autovalores explicam a variância dos dados ao longo dos eixos.

Para confirmar os resultados obtidos pelo PCA e SIMPER, realizamos a análise de similaridade (ANOSIM). Este teste fornece os valores de p (nível de significância) e r (força dos fatores sobre as amostras). O valor de r , oscila entre zero e um, gerando um número interpretável para a diferença entre grupos. Quando mais próximo de um (1) sugere que as semelhanças dentro dos grupos são maiores que entre os grupos (grande separação entre os níveis dos fatores), de modo contrário, valores próximos a zero indicam que não há separação, sendo indistinguível. A quantidade de permutações possíveis informa a força do teste para os dados analisados, de tal modo um número maior de permutação viabiliza o alcance de um valor de p mais preciso.

3.5.2. Capacidade sensorial

Os dados obtidos foram analisados de forma semelhante a apresentada para a flutuação numérica, por modelos mistos lineares (LME) e modelos mistos lineares generalizados (GLMM), com os pacotes *nlme* e *lme4*, no software R (versão 3.0). A influência do tamanho das guardas na capacidade sensorial foi analisada como resposta binomial (aceitação ou rejeição), a colônia de origem e a colônia testada foram incluídas como efeitos aleatórios. O tamanho da guarda e o tamanho da colônia foram utilizadas como variáveis preditoras, nos modelos testados, gerando valores de R^2 marginal (variação explicada por efeitos fixos) e condicional (variação explicada por efeitos fixos e aleatórios) (Nakagawa & Schielzeth 2013) seguindo o protocolo estatístico de probabilidade/verossimilhança de Zuur *et al.* (2009), comparando suas interações. Para verificar a influência do tamanho das guardas e das colônias. A correlação de Spearman foi utilizada para examinar a existência e/ou intensidade da relação entre o tamanho da guarda, a medida das antenas e a quantidade de sensilas placóides.

4. RESULTADOS

4.1. Variação na frequência de guardas durante o estudo

A frequência de guardas voadoras (GV) foi significativamente maior no período de observação, com média ($\pm$ D.P.) total de $1 \pm 0,8$ operárias às 09:00h, $6 \pm 1,8$ operárias às 13:00h e de $7,7 \pm 4,2$ guardas às 16:00h. Para as guardas fixas (GF) a média total foi de $7,7 \pm 3$ guardas às 09:00h da manhã, 13,4 às 13:00h e $14,1 \pm 4$ guardas às 16:00h (Graf. 1). Verificou-se que o número de guardas internas está relacionado ao diâmetro do tubo de entrada do que o horário e a temperatura, para as colônias utilizadas neste estudo se mantém entre duas e quatro guardas. Desta forma, o período subsequente para execução dos ensaios experimentais foi determinado entre 12:00h e 17:00h.

Gráfico 1. Frequência de guardas voadoras, fixas e no interior da entrada de 8 colônias de *T. angustula* durante o período de observação.

4.1.1. Influências climáticas

O número de GV se manteve estável durante o período de coleta de dados (Graf. 2), para as GF ocorreu um acréscimo durante os meses dezembro, janeiro e fevereiro. As médias mensais de temperatura, umidade e precipitação referente a cada mês na região de estudo estão na Tabela 4. As colônias 1, 2, 4 e 10 foram aquelas que apresentaram maior frequência de guardas em relação à média geral (GF = 17,8 e GV = 4,8) quando comparamos o número de guardas apresentados pelas colônias durante o período de testes.

Gráfico 3. Número de guardas voadoras (GV) e guardas fixas (GF) de *Tetragonisca angustula* por colônia, relativo a todo o período de testes, contagens referentes a T1 (antes da apresentação).

Gráfico 2. Número de guardas referente aos meses de 2017 e início de 2018.

Tabela 4. Médias mensais de Temperatura, Umidade e Precipitação durante o estudo.

Ano	2017								2018	
Meses	Fev.	Mar	Abr.	Mai	Set	Out	Nov.	Dez	Jan	Fev.
Temp. Média °C	30.6	30.0	29.5	30.1	33.0	32.8	30.4	30.7	30.7	31.4
Umid. Média	52%	51%	50%	47%	27%	40%	30%	49%	57%	40%
Precipitação (mm)	97,2	84,8	64,1	91,7	6,6	93,3	154,5	193,1	211	118,4

Não foram realizados testes nos meses de junho, julho e agosto pois são os meses com temperaturas baixas, reduzindo a atividade de forrageio e de guarda. A temperatura mais baixa neste intervalo foi de 11,4°C e mais alta de 21,8°C. Os meses com temperaturas mais altas, com máxima absoluta de 38,6°C ocorreram em outubro de 2017. Em novembro, dezembro de 2017 e janeiro e fevereiro de 2018, a máxima esteve em torno de 35°C, a mínima neste período foi de 18°C.

4.2. Bioensaios

Foram realizados ~1100 testes no total, subdivididos em 2 tempos (antes e depois) com 550 observações cada.

4.2.1. Atos comportamentais observados durante os experimentos

A descrição sucinta da resposta comportamental de reconhecimento e/ou exibição em resposta à apresentação das iscas é descrito na Tabela 5 e nas Figuras 15 a 19.

Tabela 5. Comportamentos observados durante os Bioensaios, acrônimos e descrição operacional.

Sigla	Comportamento	Descrição
S	Sinalização	GF Levanta o abdômen e bate as asas por mais de 5 segundos constantes
C	Conturbação	agitação, GF inicia movimentação anormal e aumentada
P	Aproximação	um indivíduo se aproxima da isca, mas não a toca
T	Toque	uma guarda toca a isca, porém não há “mordida” (fechamento das mandíbulas sobre alguma parte do corpo de outro indivíduo)
G	Agrupamento	as guardas se aproximam da ameaça em conjunto
A	Ataque	a guarda trava as mandíbulas na isca ou quando há investidas semelhantes a jogar a isca no chão
R	Recrutamento	quantidade de guardas aumenta após a apresentação comparando com o momento inicial
O	Oposição	GF se posicionam ao lado oposto da apresentação da isca, em relação ao tubo de entrada
E	Evasão	quantidade de guardas reduz a metade ou menos que o inicial
I	Indiferença	Não ocorre sinais de perturbação à presença do intruso.

Figura 15. Comportamento de Sinalização. Indivíduo levanta o abdômen e começa a "bater" as asas. A) atividade normal das guardas; B) início de sinalização das guardas apontadas com setas; C) guarda mantém por mais de 5 segundos consecutivos o comportamento; D) as guardas presentes no tubo de entrada também iniciam sinalização.

Figura 16. Apresentação do tratamento Controle, papel filtro com cola utilizada para colagem dos espécimes. A) antes da apresentação; B) início do testes com Controle caminhando; C) após 30 segundos não há resposta aparente de ambas as guardas; D) ao final do teste as guardas permanecem nas mesmas posições iniciais, sem sinais de conturbação.

Figura 17. Oposição (O), guarda se movimentam para o lado oposto do tubo de entrada referente a isca (*Camponotus* sp.). A) antes da apresentação, B) início da movimentação e conturbação das GF; C) redução do número de guardas; D) as GF moveram para o lado oposto do tubo, alguns indivíduos iniciaram voo.

Figura 18. Imagem de comportamentos exibidos pelas guardas de *T. angustula* durante os bioensaios com a isca *L. limao*. A) Início de teste e comportamento de Sinalização (S), B) aproximação (P), C) Toque (T) e Ataque (A), GV permanece em ataque D) Agrupamento (G) aproximação de 2 ou mais guardas ao intruso simultaneamente.

Figura 19. Comportamento de Evasão (E) em teste com *Camponotus* sp. A) posição inicial de GF; B) início da apresentação, conturbação das GF; C) redução do número de GF e movimentação para o lado oposto do tubo (O); D) Evasão (E), redução da quantidade de indivíduos para metade da inicial ou menos, ao final apenas uma guarda permaneceu no tubo.

4.2.2. Flutuação Numérica entre tratamentos

De modo geral, o número médio de guardas é relativo a colônia, causando ampliação do desvio padrão, porém não têm influência na oscilação total entre os tempos (T1=antes, T2=depois). Este fator é visível nos resultados de expostos no gráfico 6, referente ao controle, que apresentaram estabilidade numérica de ambos tipos de guardas (GV e GF) para cada colônia entre os tempos e confirmado quando analisado estatisticamente (Tab. 6).

Gráfico 4. Número médio de guardas para os tempos antes e depois de apresentados ao Controle, voando e caminhado, destaque para a diferença de guardas por colônias.

Em ambos os modelos de apresentação a resposta a isca *L. limao* foi expressiva (Gráfico 6), com maior intensidade para as GV, duplicando a quantidade média de guardas (Recrutamento=R). Quando apresentada voando, o número de GV aumenta exponencialmente ($p < 0,0001$), já a variação do número de GF não foi significativa ($p = 0,091$), reduzindo o número de abelhas GF (Tab. 6).

Podemos destacar ainda que a quantidade de GF foi reduzido à metade da inicial (Evasão=E) quando apresentado as iscas Camponotus e Aranha (Tab. 6, Graf 5). Para iscas aladas quando ocorreu redução de GF o número de GV aumentou, portanto é possível que tenha ocorrido uma modificação entre os tipos de guardas (Graf. 6).

Tabela 6. Média do número de guardas de *T. angustula* antes e depois dos experimentos de introdução dos espécimes de teste. (App) modelo de apresentação; (GV) guarda voadora; (GF) guarda fixa; (*) $p > 0.001$; (-) $p > 0.09$.

Sigla	Espécie Isca	App	GV		GF	
			Antes	Depois	Antes	Depois
lima	<i>Lestrimelitta limao</i>	Voa	5 ($\pm$ 3)	12.4 ($\pm$ 5.7) *	15.3 ($\pm$ 6.4)	12.3 ($\pm$ 7.7) -
lima	<i>Lestrimelitta limao</i>	Caminha	5.6 ($\pm$ 2.3)	11.1 ($\pm$ 4.1) *	18.9 ($\pm$ 7.6)	10.8 ($\pm$ 6.9) *
vesp	<i>Trachipus boharti</i>	Voa	3.3 ($\pm$ 2.1)	4.4 ($\pm$ 3.4) -	15.5 ($\pm$ 6.1)	14.6 ($\pm$ 5.8)
vesp	<i>Trachipus boharti</i>	Caminha	4.1 ($\pm$ 1.8)	5.5 ($\pm$ 2.8) *	17.3 ($\pm$ 5.6)	11.9 ($\pm$ 6.4) *
scap	<i>Scaptotrigona aff. depilis</i>	Voa	4.3 ($\pm$ 1.5)	4.8 ($\pm$ 2.4)	16 ($\pm$ 8.9)	14.6 ($\pm$ 8.6)
scap	<i>Scaptotrigona aff. depilis</i>	Caminha	4.2 ($\pm$ 1.8)	5.3 ($\pm$ 2.4)	17.9 ($\pm$ 5.8)	13.1 ($\pm$ 6.6) *
Cont	Controle	Voa	4.4 ($\pm$ 1.4)	4.5 ($\pm$ 1.6)	21.7 ($\pm$ 5.8)	21.4 ($\pm$ 5.8)
Cont	Controle	Caminha	5.9 ($\pm$ 2.3)	6.3 ($\pm$ 2.5)	19.7 ($\pm$ 8)	19 ($\pm$ 7.5)
comp	<i>Camponotus</i> sp.		4.2 ($\pm$ 2.3)	4.3 ($\pm$ 2.3)	16.1 ($\pm$ 6.8)	8.1 ($\pm$ 5.7) *
aran	<i>Menemerus</i> sp.		4.6 ($\pm$ 2)	4.3 ($\pm$ 2.3)	14.7 ($\pm$ 6.8)	8.7 ($\pm$ 5.7) *
atta	<i>Atta sexdens</i>		4.5 ($\pm$ 2.8)	5.2 ($\pm$ 2.3)	16 ($\pm$ 7.8)	10.5 ($\pm$ 6.7) *
acro	<i>Acromyrmex subterraneus</i>		6.5 ($\pm$ 2.5)	6.6 ($\pm$ 2.8)	19.5 ($\pm$ 6.9)	18.2 ($\pm$ 7.7) -

Para iscas ápteras observamos maior oscilações sobre o número de GF (Gráficos 5), já para os intrusos alados as flutuações são mais condicionadas a espécie isca. Para a apresentação caminhando observamos maior distinções entre os tempos, antes e depois, do que quando o modo de apresentação foi voando (Graf 6). O número de GV aumentou em durante a apresentação de Vespa (*Trachipus buharti*) e Limao (*Lestrimelitta limao*) (Tab. 6 e Gráfico 6). Essa flutuação ocorreu de maneiras diferentes, que serão descritas separadamente por espécies na sessão “3.2.3. Respostas comportamentais”, reunindo informações sobre a quantidade de guardas e suas respostas comportamentais.

Gráfico 5. Flutuação do número de guardas fixas e guardas voadoras, entre os tempos antes e depois, durante apresentação de espécies-iscas áptera. Espécies ápteras foram apresentadas apenas caminhando.

Gráfico 6. Flutuação do número de guardas fixas e guardas voadoras, entre os tempos antes e depois, dos bioensaios com espécies-iscas aladas. Coluna esquerda referente ao modelo de apresentação de intruso caminhando e Coluna direita referente ao modelo de apresentação do intruso voando.

4.2.3. Respostas comportamentais

Para simplificar as comparações unimos os comportamentos em grupos, relacionados a agressividade ou a falta dela. Assim seriam respostas:

- Alarme, referente a Sinalização (S) e Conturbação (P).
- Agressivas, referente a Agrupamento (G), Aproximação (P), Toque (T), Ataque (A) e Recrutamento (R);
- Defensivas, referente a Oposição (O) e Evasão (E);

Controle

Nos experimentos controle as respostas predominantes foram de indiferença de ambas as guardas. Nas apresentações voando, observamos que as GV, no geral, apresentaram menor quantidade de reações, ignorando completamente (GV I=100% e GF I=81%) a presença de um “objeto estranho” para a atividade cotidiana da colônia (Graf. 7). Verificamos que as poucas aproximações exibidas pelas GF (P=19%) foram provenientes de testes com colônias diferentes. Notamos ainda que a flutuação numérica de guardas se manteve estável entre os tempos (Tab. 7 e 8) durante os testes.

Lembramos que o registro uma reação qualquer, reduz a porcentagem de indiferença, relativa a ausência de resposta. As GF foram indiferentes em 62% dos testes controle caminhando. Os comportamentos exibidos no restante dos testes, ocorreram em testes com colônias diferentes, deste não coincidiram. No total as GF exibiram a conturbação (C=16,7%) e sinalização (S=8,3%). O comportamento de oposição foi referente a dois de 24 testes (O=8,3%) (Graf. 7).

Tabela 7. Flutuação numérica das guardas de *T. angustula* ao tratamento Controle, caminhando.

Caminhando	GV		GF	
	Antes	Depois	Antes	Depois
min	2	2	6	6
máx.	12	13	33	29
média	5.9	6.3	19.7	19.0
desvio padrão	2.3	2.5	8.0	7.5

Tabela 8. Flutuação numérica das guardas de *T. angustula* ao tratamento Controle, caminhando.

Voando	GV		GF	
	Antes	Depois	Antes	Depois
min	2	2	13	13
máx.	7	8	32	31
média	4.4	4.5	21.7	21.4
desvio padrão	1.4	1.6	5.8	5.8

Gráfico 7. Porcentagem de comportamentos exibidos por GV e GF durante os bioensaios com apresentação do Controle (papel filme + Super Cola).

Acromyrmex subterraneus

De modo semelhante as apresentações do teste Controle, as guardas não exibiram comportamentos em grande parte dos testes (GV, I=67%; GF, I=54%), além disso também não ocorreram alterações na quantidade de guardas entre os tempos (GV: antes 6,5($\pm$ 2,5), depois 6,6 ($\pm$ 2,8); GF: antes 19,5 ($\pm$ 6,9), depois 18.2 ($\pm$ 7,7)). *A. subterraneus* foi apresentado apenas caminhando, sendo as GF responsáveis pela maioria das reações exibidas à presença deste intruso (Graf. 8).

Este espécime não representa uma ameaça a colônia, entretanto é de cor escura e morfologia distinta. Mesmo com estas características, a aproximação das guardas ao intruso foi incomum (P=16,7%) e somente GF o tocou (T=4,2%) durante o experimento. Ao aproximarmos esta formiga a entrada da colônia, as GF exibiram comportamentos de alarme, sendo eles, sinalização (S=25%) e conturbação (C=17%) e em alguns casos, moveram-se para o lado oposto do tubo (O=8,3%).

Gráfico 8. Porcentagem de comportamentos exibidos por GV e GF durante os bioensaios com apresentação do intruso *Acromyrmex subterraneus*.

Atta sexdens

Geralmente, com a aproximação deste intruso ao de entrada, as GF exibiram intensa conturbação (C=88%), repetidas vezes sinalizaram de modo incessante (S=54%) ao longo da exposição. Ambas as guardas aproximam (P=25%) o intruso, entretanto foi atacado poucas vezes e somente pela GF (A=8%) (Graf. 9). Durante o evento de ataque notamos que as GF se afastavam da posição inicial, indo para as laterais do tubo, então uma guarda se aproxima da isca e a ataca, assim começa um movimento conjunto (GF G=4,2%; GV G=8,3%) em direção do espécime, então as GF agarram as pernas da formiga e mantém a mandíbula presa (Figura 20).

Gráfico 9. Porcentagem de comportamentos exibidos por GV e GF durante os bioensaios com apresentação do intruso *Atta sexdens*.

Figura 3. Sequência de comportamentos exibidos pelas GF durante apresentação de *Atta sexdens*. A) posição original das guardas; B) início do teste, as GF performam sinalização (S), e se movimentam na direção da isca, causando conturbação (C); C) Aproximação (P) de GF a isca, alguns indivíduos iniciam voo; D) ao aproximação o intruso as guardas movimentam as antenas, tocam (T) a isca e sinalizam; E) as GF mais próximas atacam a isca, em sequência outras guardas se aproximam.

Em metade dos testes as GF se afastaram e se posicionaram do lado o oposto do tubo (O=50%), se retirando (E=20%), provocando redução significativa do número médio de GF ($p < 0,001$) entre os tempos antes (média±D.P.: antes $16 \pm 7,8$ depois $10,5 \pm 6,7$). Mesmo exibindo uma porcentagem similar de Evasão (E, 16,7%), as GV apresentaram acréscimo em sua quantidade, porém com uma alteração menor entre os tempos (média±D.P.: antes $4,5 \pm 2,8$ depois $5,2 \pm 4,1$; $p = 0,234$), o que pode estar associado aos casos raros de recrutamento (R, 4,2%). Notamos também que o episódio de recrutamento coincidiu com um ataque e com aproximações em conjunto das GF (G=4,2%) e também das GV (G=8,3%) (Graf. 9).

Camponotus sp.

Esta espécie provocou uma resposta defensiva singular das GF, com frequente conturbação (C=62,5%), oposição (O=41,7%) e rápida evasão (R=58,3%) (Fig. 17, Graf. 10), o que promoveu intensa redução do número de indivíduos ($p < 0,0001$; média±D.P.: antes $16,1 \pm 6,7$ depois $8,1 \pm 7,7$), com casos que todas as GF se retiraram. Notamos ainda que o comportamento de evasão quando esta espécie foi apresentada ocorreu principalmente com a entrada das GF para o interior da colônia, consequentemente a quantidade de GV se manteve estável ($p = 0,83$; T1 $4,2 (\pm 2,3)$; T2 $4,3 (\pm 2,3)$). As GV tiveram pouca representação neste caso, com apresentando apenas uma Agrupamento (G=4%) dentre o total de ensaios ($n = 24$). Em alguns testes ocorreu recrutamento de GV (R=8,3%), contudo, tendo em vista que as aproximações ao intruso foram incomuns (P=4,2%), este evento pode ser um reflexo de GF.

Gráfico 10. Porcentagem de comportamentos exibidos por GV e GF durante os bioensaios com apresentação de *Camponotus sp.*

Aranha (Menemerus sp.)

Quando este espécime foi apresentado o primeiro comportamento exibido pelas GF foi de sinalização (S=34,8%), em seguida ocorria grande conturbação (C=82,6%), frequentemente as GF moviam-se para o lado oposto do tubo (O=65,2%) e se retiravam (E=30,4%) (Graf. 11, Fig. 21). O que provocou redução do número de GF expressiva ($p < 0,0001$) entre os tempos (média±D.P.: antes 14,7±6,8 e depois 8,7±5,7). Observamos que durante o comportamento de evasão indicado, muitos indivíduos iniciaram voo, porém pairavam afastadas do tubo de entrada, ultrapassando as bordas externas do papel cartão e da área registrada em vídeo, gerando raros recrutamentos (R=4,3%) para as GV e poucas evasões (E, 17,4%). Logo, a quantidade de GV permaneceu estável (média±D.P.: antes 4,6±2; depois 4,3±2,3; $p=0,72$).

Assim como ocorre para *Camponotus*, a reação de GV a este intruso áptero é mínima (média±D.P.: antes 4,6±2; depois 4,3±2,3; $p=0,72$). Os comportamentos agressivos foram incomuns, ocorrendo poucos aproximações (P=13%) de GV, frequência que foi mais elevada para as GF (P=21,7%). Verificamos, entre os testes, que coincidiram os comportamentos de toque e ataque das GF (T e A=4,3%).

Gráfico 11. Porcentagem de comportamentos exibidos por GV e GF durante os bioensaios com apresentação de *Menemerus* sp.

Figura 4. Comportamento das GF durante apresentação de aranha saltadora (*Menemerus* sp). A) antes da apresentação; B) início do teste; C) aproximação das GF a isca e sinalização de guardas na parte inferior da imagem; D) GF aproximam e exibem sinalização; E) Ataque a isca; F) após ataque, a guarda atacante inicia voo e outro indivíduo se aproxima exibindo sinalização com abdômen mais elevado, próximo a isca.

Lestrimelitta limao

Os resultados mostraram que as GV de *T. angustula* respondem de modo singular e efetivo a presença de um indivíduo de *L. limao*. Entre todos tratamentos, este intruso provocou maior frequência de recrutamentos, nos dois modos de apresentação (caminhando e voando). Porém podemos notar que a resposta de ambas as guardas foram diferentes entre os tipos de apresentação (Graf. 12).

Voando

As GV foram responsáveis pela maioria das respostas provocadas pela presença deste intruso, que foram agressivas (GV) e de alarme (GF). Em praticamente todos os testes as GV aproximam o intruso ($P=95,8\%$), e o tocaram ($T=91,7\%$), o que frequentemente sucedia em

ataques (A=75%), apesar disto, as aproximações em conjunto foram incomuns (G=16,7%) (Fig. 18).

Após os ataques a quantidade de GV aumentava de forma expressiva (média±D.P.: 5 ± 3 depois $12.4\pm5,6$), promovendo alta frequência de recrutamentos (R=75%) (Fig. 8). Diferente do registrado para outras espécies-isca, quando as GV exibiam recrutamento, a flutuação numérica das GF foi pequena ($p=0.0913$) reduzindo sua quantidade entre os tempos (média±D.P.: antes $15,3\pm6,4$ depois $12,3\pm7,6$), exibindo evasão em 25% dos testes. Durante a apresentação as GF frequentemente exibiram conturbação (C=50%) e sinalização (S=45,8) (Graf. 14).

Gráfico 12. Porcentagem de comportamentos (%) exibidos pelas guardas quando confrontadas a *L. limao* voando (superior) e caminhando (inferior).

Quando a isca era removida e afastada da colônia as guardas mantinham-se agarradas a isca (Figura 22), algumas se aproximavam e ficavam pairando no seu entorno, mesmo quando distante do ninho (2 a 5 metros).

Figura 5. Comportamentos observados após a remoção da isca. A) frequentemente as GV a encontravam, mesmo a dois metros de distância; B) os indivíduos que atacaram mantinham-se agarradas a isca por muitos minutos, muitas vezes causando morte da guarda; C e D) guarda de *T. angustula* decapitada por indivíduo de *L. limao*; E) Comportamento de recrutamento de centenas de guardas após exposição a isca.

Caminhando

Os dados apresentados no gráfico 12, promovem fácil visualização da distinção das respostas das GF entre os modos de apresentação do intruso. Quando aproximamos a isca caminhando a entrada da colônia as GF apresentação maior frequência de comportamentos de alarme e agressivos. Este episódio é refletido na flutuação numérica das guardas, gerando aumento na quantidade de GV (média±D.P.: GV: antes $5,6 \pm 2,3$ depois $11,08 \pm 4$) e redução das GF (antes $18,9 \pm 7,6$ depois $10,8 \pm 6,8$). Portanto os comportamentos de recrutamento das GV (R66,7%) e evasão das GF (E=50%) foram mais frequentes.

As GF frequentemente exibiram conturbação (C=83,3%) e sinalização (S=79,2%), e alta apresentando alta frequência de ataque (A=75%) e consequentemente aproximação (P=87,5%)

e toques ($T=79,2\%$) ao intruso *L. limao*. A frequência de aproximações apresentados pelas GV ($P=37,5\%$) foi aproximadamente 1/3 de quando a isca foi apresentada voando, portanto, os toques ($T=79,2\%$) e ataques ($A=16,7\%$) foram ainda mais incomuns (Graf. 12).

Figura 6. No momento de remoção da isca *L. limao* as guardas voadoras disperçam, saindo do campo de visão do video. A) durante a apresentação e ataque ao intruso, B) momento de remoção, C) dispersão das guardas em até 10 segundos após a remoção.

Scaptotrigona aff. depilis

Voando

Quando esta espécie-isca foi apresentada voando, a maioria das respostas observadas indicavam comportamentos agressivos e de alarme (Graf. 13). Um dos primeiros comportamentos observados foram conturbação das GF (C=21,7%) e seguido de sinalização (S=39%). Raramente as GF iniciavam voo (E=4,3), pairavam próximo à entrada da colônia, logo a quantidade de indivíduos teve mínima redução entre os tempos ($p=0,34$; média $\pm$ D.P.: $16\pm 8,9$ para $14,6\pm 8,6$). Ao mesmo tempo, alguns indivíduos se moviam para o lado oposto do tubo em relação a isca (O=4,3%).

As respostas agressivas a isca iniciou com aproximações das GV (P=78,3%), favorecendo agrupamentos (G=30,4%). Estas guardas sucederam para o toque (T=34,8) em ~40 % das aproximações, porém o ataque ocorreu em somente 13% dos testes. Em alguns casos, após o toque, as GV que estavam fora da área registrada se aproximavam da entrada da colônia, consequentemente o número de GV aumentou fracamente (R=8,7%) expressado pela média $\pm$ D.P. de guardas antes $4,3 \pm 1,5$ e depois $4,8 \pm 2,4$ dos testes. Em cerca de 15% dos testes as guardas foram indiferentes a presença da isca.

Caminhando

A aproximação da isca caminhando gerou mais respostas agressivas das GF. O agitação destas guardas ocorreu em quase todos os testes (C=83,3%), muitas vezes exibindo o comportamento de sinalização (S=66,7%). Em metade dos testes as GF se aproximam da isca (P=50%), seguindo para toque em 1/3 deles. Em alguns casos as guardas se aproximam em conjunto (G=16,7%), de maneira semelhante a como ocorre para aranhas saltadoras (Fig. 9). Mas os ataques foram mais frequentes para *S. aff. depilis* (A=16,7%). Muitas vezes as GF se afastavam da isca, movendo-se para o lado oposto do tubo (O=33,3) e/ou iniciando voo (E=16,7%), reduzindo expressivamente ($p<0,0001$) o número de indivíduos presentes no tubo de entrada (média $\pm$ D.P.: $17,9\pm 5,8$ para $13,1\pm 6,6$) ao final dos testes.

Gráfico 13. Porcentagem de comportamentos exibidos pelas guardas quando confrontadas a *Scaptotrigona aff. depilis*.

Apesar de causar muitas respostas comportamentais nas GF, as reações exibidas pelas GV tiveram uma frequência menor, incluindo indiferença a isca em 1/3 dos testes (I=33,3). Ainda assim, as guardas que pairavam próximo ao tubo, realizaram aproximações a isca em alguns testes (P=38,9%), apesar disso a frequência de toques e ataques foi menor (T=11,1% e A=11,1%). A quantidade de GV, entre os tempos, não sofreu alterações significativas (média±D.P.: 4,2±1,8 e 5,3±2,4; p=0,145).

Trachipus buharti

A resposta a esta vespa apresentou menor quantidade de ataques quando apresentada caminhando, do que quando apresentada voando. Independentemente do modo de apresentação ocorreram muitas aproximações de GV (Graf. 14, Fig. 24).

Voando

Esta isca provocou respostas mais agressivas quando apresentada voando. As aproximações de GV foram muito frequentes ($P=70,8\%$) inclusive $\sim 21\%$ delas foi em conjunto (G). As guardas tocaram na isca em $1/3$ ($T=33,3$) e procedeu em ataque com frequência similar aos Agrupamentos (A e $G=20,8\%$). Portanto, 40% das aproximações não promoveram toque ou ataque a isca. Em poucos casos as guardas não apresentaram reações a presença da isca (GV, $I=12,5\%$; GV, $I=8,3\%$).

A quantidade de GV aumentou sutilmente (média $\pm$ D.P.: $3,3\pm 2,1$ a $4,4\pm 3,4$; $p=0,5559$), ocorrendo recrutamento em apenas um teste ($R=4,2\%$), o qual apresentou aproximação, toque e Agrupamento de GV, mas a isca não foi atacada no caso em questão.

As GF exibiram poucas reações a apresentação de *T. buharti* voando, que consistiram em mais sinalizações ($S=37,5\%$) que conturbações ($C=12,5\%$) e foi indiferente em $8,3\%$ dos testes. A quantidade de GF não sofreu alterações bruscas (média $\pm$ D.P.: $15,5\pm 6,1$ e $14,6\pm 5,8$).

Figura 7. Aproximação e ataque ao intruso *T. buharti* apresentado voando. A) posição original das GF; B) aproximação de GV; C) ataque por GV e conturbação de GF.

Gráfico 14. Porcentagem de comportamentos exibidos por GV e GF durante os bioensaios com apresentação da vespa *Trachipus buharti*.

Caminhando

As reações exibidas a esta isca, quando apresentada caminhando, foram mais intensas e frequentes, provocando ampla flutuação no número de guardas, comparando com apresentações voando. As GF apresentaram uma variedade maior de comportamentos. Correspondendo a respostas de alarme, mostrando agitação em metade dos ensaios (C=50%), a sinalização (S=31,8%) e aproximações (P=31,8%) tiveram frequências equivalentes. No entanto, observamos que os ataques (GF, A=9,1%) ocorreram quando as GF ficavam agitadas, realizando conturbação, mas não sinalização (testes em colônias diferentes). As respostas de sinalização das GF antecederam 30% das aproximações realizados pelas GV (P=63,6%).

Ambas as guardas tocaram a isca em 18,2% dos testes, mas apenas as GF a atacou. É interessante notar que ocorreram poucos recrutamentos ($R=9,1\%$) das GV, porém observando a flutuação do número de guardas ante e depois do ensaio, notamos uma intensa redução da quantidade de GF ($p<0,0001$, média $\pm$ D.P.) iniciando com $17,3\pm5,6$ e finalizando com $11,9\pm6,4$ indivíduos ($E=18,2\%$). De tal modo, é possível que o recrutamento aqui apresentado pelas GV seja proveniente de GF que iniciaram voo, provocando acréscimo no número de guardas que pairavam próximas a entrada da colônia (média $\pm$ D.P.: $4,1\pm1,8$ e $5,5\pm2,8$; $p=0,004$). Podemos inferir, ainda que este intruso causou conturbação para guardas de *T. angutula*, pois apresentaram o comportamento de Indiferença (I) em apenas 4,5% dos testes (Graf. 14).

4.2.4. Respostas Comportamentais entre tratamentos

Ao compararmos as respostas apresentadas aos intrusos para as GF e as GV separadamente, verificamos que o modo de apresentação promoveu reações distintas, gerando junções dos tratamentos por similaridade, referente a frequência e tipo de comportamento exibidos.

Há maior frequência de respostas exibidas pelas GF quando o modo de apresentação da isca é caminhando, o contrário acontece com as GV, respondendo quando os espécimes são aproximados voando. Quando comparamos as outras espécies iscas a reação das guardas quando expostas a *L. limao* são mais intensas, principalmente os comportamentos de Aproximação, Toque e Ataque. No entanto, o modo de apresentação causou respostas diferentes entre GV e GF.

A frequência de comportamentos por tratamento está descrita na Tabela 9 e a o tempo médio até o ataque (latência) na tabela 10.

Tabela 9. Matriz de frequência dos comportamentos (%) exibidos pelas guardas durante os testes.

Intruso	Modo App	GF										GV									
		S	C	P	T	G	A	R	O	E	I	S	C	P	T	G	A	R	O	E	I
acro	CAM	25	17	17	4	0	0	0	8	0	54	0	0	17	0	0	0	0	0	0	67
aran	CAM	35	83	22	4	0	4	4	65	30	0	0	0	13	0	4	0	0	0	17	0
atta	CAM	54	92	25	13	4	8	0	50	21	0	0	0	25	0	8	0	4	0	17	0
camp	CAM	29	63	4	0	0	0	0	42	58	4	0	0	0	0	4	0	8	0	0	4
cont	CAM	8	17	4	0	0	0	0	8	0	63	0	0	4	0	0	0	0	0	0	92
lima	CAM	79	83	88	79	0	75	0	0	50	0	0	0	38	25	8	17	67	0	0	0
scap	CAM	67	83	50	28	17	17	0	33	17	6	0	0	39	11	0	11	0	0	0	33
vesp	CAM	32	50	32	18	0	9	0	5	18	5	0	0	64	18	5	0	9	0	0	5
cont	VOA	0	0	19	0	0	0	0	0	0	81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
lima	VOA	50	46	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	96	92	17	75	75	0	0	0
scap	VOA	39	22	0	0	0	0	0	4	4	17	0	0	78	35	30	13	9	0	0	13
vesp	VOA	38	13	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	71	33	21	21	4	0	0	13

Tabela 10. Latência, média do tempo inicial do teste até o momento do ataque ao intruso.

Intruso	Modo App	Início App	Tempo de App	Termino App	Ataque	Latência
acro	CAM	00:01:20	00:01:07	00:02:28	na	
aran	CAM	00:01:23	00:01:36	00:03:00	00:01:12	00:00:08
atta	CAM	00:01:23	00:01:37	00:03:00	00:02:22	00:00:59
camp	CAM	00:01:23	00:01:38	00:03:02	na	
cont	CAM	00:01:18	00:01:08	00:02:25	na	
lima	CAM	00:01:13	00:01:06	00:02:19	00:01:26	00:00:14
scap	CAM	00:01:22	00:01:49	00:03:10	00:02:06	00:00:47
vesp	CAM	00:01:12	00:01:42	00:02:53	00:01:39	00:00:30
cont	VOA	00:01:15	00:01:11	00:02:27	na	
lima	VOA	00:01:16	00:01:39	00:02:55	00:01:45	00:00:30
scap	VOA	00:01:19	00:01:29	00:02:47	00:02:13	00:00:39
vesp	VOA	00:01:08	00:01:36	00:02:43	00:02:02	00:00:58

Guarda Voadora

A análise de similaridade (ANOSIM) confirmou que há separação entre os modelos de apresentação caminhando e voando ($p=0.04$; $r=0.33$). O teste de similaridade percentual (SIMPER) mostrou que o comportamento de aproximação (P) e indiferença foram os fatores principais para os resultados apresentados, com contribuição de ~25%, cada um, o toque apresentou ~12% e ataque 7,5%.

Na análise componentes principais (PCA) realizada para a frequência de repostas exibidas por GV (Gráfico 18), podemos observar que os comportamentos agressivos resultaram em uma significativa separação da isca-espécie *Lestrimelitta limao* (lima) dos outros intrusos. O PC 1 (~70%) separou os tratamentos entre respostas agressivas (valores positivos) e o comportamento de indiferença (valores negativos). Já o PC 2 (~18%), foi influenciado pelos comportamentos de ataque (A), toque (T), recrutamento (R) e indiferença (I) para valores positivos, e o agrupamento (G) e evasão (E) para valores negativos (Graf 15).

A análise conjunta de ambos componentes principais, mostrou que Controle (cont) e *L. limao* (lima) se agrupam no mesmo eixo da PC2 (parte superior do gráfico), mas em extremidades opostas. O comportamento de aproximação (P) mostrou similaridades de respostas dos testes com *T. buharti* (vesp) e *S. aff. depilis* (scap), modelo de apresentação: voando, e *T. buharti* (vesp) caminhando, sendo o último com mais agrupamentos (G). Neste mesmo resultado, os intrusos ápteros (*Atta sexdens* (atta), *Menemerus* sp. (aran) e *Camponotus* sp. (camp) apresentaram colinearidade na PC 1 (valores negativos), principalmente no comportamento de evasão (E). As iscas *A. subterranius* (acro) e *S. aff. depilis* (scap) caminhando tiveram respostas menos agressivas e consideradas mais neutras, aproximando-se do grupo controle.

Gráfico 15. Na análise componentes principais (PCA) da frequência de repostas exibidas por GV durante os experimentos, e seus carregamentos (Loadings). Modelo de apresentação: caminhando (quadrado preto), voando (quadrado laranja).

Guarda Fixa

A frequência de reações exibidas entre os modos de apresentação, pelas guardas fixas, não tiveram distinção significativa (ANOSIM, $p=0.415$; $r=0.017$). O teste de similaridade percentual (SIMPER) mostrou que os comportamentos que mais contribuíram para os resultados foram a conturbação das guardas com 26,2% de contribuição, e indiferença com 16,4%. O mesmo pode ser observado no carregamento (Loading) da análise de componentes principais (PCA, Gráf. 19).

Assim, como ocorrido para as guardas voadoras, o PC1 gerou uma separação espacial entre o comportamento de indiferença (valores negativos) e os comportamentos agressivos e de alarme (valores positivos), sendo a conturbação (C) o comportamento de mais relevante. O PC2 (vertical) agrupou mais aqueles comportamentos defensivos (valores negativos), principalmente de oposição (O), já os comportamentos agressivos de ataque (A), aproximação (P) e toque (T) foram colineares junto a indiferença (I).

No gráfico 16 (PC 1 negativo, PC 2 positivo) observamos que controle (cont) e as respostas à *A. subterraneus* foram similares e considerados neutros. Os tratamentos *T. buharti* (vesp) e *S. aff. depilis* (scap) voando apresentaram valores próximos a zero para o PC2, ou seja, pouco significativos. Nestes grupos o comportamento de indiferença foi mais importante na contribuição do eixo.

De modo antagônico, a apresentação da *L. limao* (lima) resultou em respostas mais efetivas por parte das guardas, revelando a maior frequência de comportamentos agressivos (aproximação, toque e ataque) dentre os outros intrusos e modo de apresentação. Quando esta espécie-isca foi apresentada voando, se mostrou neutra com relação a comportamentos agressivos, mas teve pouca influência do comportamento de oposição (O).

As respostas defensivas, principalmente o comportamento de oposição (O=13% de contribuição), aproximaram as espécies-iscas *Camponotus* sp. (camp), *Menemerus* sp. (aran) e *Atta sexdens* (atta). Entre estes intrusos, *atta* resultou maior frequência de respostas agressivas e de alarme levando a ser isolada no eixo 1.

Gráfico 16. Análise de componentes principais (PCA) para a frequência de repostas exibidas por GF durante os experimentos, e seus carregamentos (Loadings). Modelo de apresentação: caminhando (ponto azul), voando (ponto roxo).

Comparação entre guardas fixas e guardas voadoras

Os resultados verificados a partir da análise ANOSIM indicam que ocorreu separação significativa entre as respostas comportamentais apresentadas pelas guardas fixas (GF) e pelas guardas voadoras (GV) ($p < 0.001$; $r = 0.27$). Os comportamentos relevantes para os componentes principais concorrem àqueles apresentados quando as guardas são separadas. As respostas de alarme (C=24%, S=14%), de indiferença (I=15,5%) e aproximação (P=13,5%) apresentam maior relevância quando analisamos os resultados entre as guardas (Graf. 17).

As respostas de GV para *Lestrimelitta limao* (lima) quando apresentada voando estão mais relacionadas aos comportamentos agressivos, mostrando que os valores isolam o grupo no eixo, deixando o grupo mais distante do centro do gráfico. O mesmo acontece para a resposta de GF quando *L. limao* é apresentada caminhando, com adição dos comportamentos de alarme, levando o grupo de resposta ao ponto mais distante e mais à extremidade do eixo cartesiano, porém em posições opostas verticalmente (inferior).

As respostas exibidas pelas GV a *S. aff. depilis* voando foram semelhantes as apresentadas para *T. buharti*, mas em menor intensidade quando comparado com *L. limao*. Nas duas primeiras espécies ocorreram agrupamento, aproximação e ataques, porém raramente recrutamento. Os comportamentos defensivos e de alarme unem as respostas da GF a apresentação caminhando de vesp, scap, atta, aran e camp e voando de Limao.

As respostas de GF e GV para *Scaptotrigona aff. depilis* (scap) e *Trachipus buharti* (Vespa) formaram um agrupamento de similaridade quando apresentada voando, porém, os comportamentos relativos foram diametralmente opostos. As respostas da GF para estas iscas, voando, foram consideradas pouco significativas (próximas ao centro cartesiano), mostrando colinearidade com os comportamentos neutros de evasão (E), oposição (O) e ausência de resposta (I), e também, mais próximos aos comportamentos neutros apresentados por GV para *Menemerus* sp. (aran), *Camponotus* sp. (camp) e *Atta sexdens* (atta). Enquanto a resposta da GF para as iscas Scapto e Vespa quando apresentadas caminhando foram plotadas abaixo do centro, sendo assim, mais relacionada com os comportamentos de alarme e comportamentos defensivos, adicionalmente os comportamentos de agressão levaram scap mais à direita do centro que vesp.

Gráfico 17. Análise de componentes principais (PCA) da frequência de repostas comportamentais exibidas por GV e GF durante os bioensaios. (a) plotagem de carregamentos (Loadings PC 1); (b) plotagem de carregamentos (Loadings PC 2).

4.3. Relação tamanho e capacidade de reconhecimento

As GF mostraram rejeição ao indivíduo não companheiros de ninho (NCN) em $73,1 \pm 13,0\%$ (média $\pm$ D.P., $N = 10$ colônias) para primeira decisão (PD). A frequência de rejeição de NCN para as decisões em grupo (DG) foi relativamente maior, alcançando $88,0 \pm 7,4\%$. A frequência de ocorrências de rejeição de indivíduos companheiros de ninho (C-N) (originários da mesma colônia testada) foi 60 % inferior, quando comparada ao teste anterior, (PD: $14,8 \pm 14,6\%$, GLMM: valor $z = 7,59$, $p < 0,0001$; DG: $26,7 \pm 22,5\%$, GLMM: valor $z = 9,8$, $p < 0,0001$) (Graf. 18). O comportamento de rejeição durante uma apresentação, registrada em vídeo, foi inserida na plataforma digital YouTube (<https://www.youtube.com/watch?v=l4gv36u7uRs>) mostrando o início da introdução de não com companheiro de ninho, em seguida de uma rejeição.

Nem o tamanho da guarda (valor $z = 0,66$, $p = 0,51$) nem o tamanho da colônia ($z = 0,08$, $p = 0,94$) afetaram a aceitação dos companheiros de ninho na PD (primeira decisão) nem na DG (guarda: valor $z = 0,8$, $p = 0,43$; colônia: valor de $z = 0,38$, $p = 0,71$) (Graf. 18). No entanto, os resultados mostraram que o tamanho da guarda afetou positivamente tanto a taxa de rejeição na PD de não companheiras de ninho (tamanho guarda: valor $z = 22,43$, $p = 0,015$) e também na DG (tamanho de guarda: valor de $z = 22,85$, $p = 0,004$)

Tabela 11. Tamanho médio de guardas das colônias utilizadas nos testes e tamanho médio da guarda coletada após o ataque a *F. varia* durante o experimento.

Média do tamanho das guardas por colônia			Média das guardas que atacaram e foram coletadas, referente a colônia testada		
	largura (mm)	altura (mm)		largura (mm)	altura (mm)
col 1	1.8	0.33	col 1	1.83	0.37
col 2	1.77	0.38	col 2	1.77	0.33
col 3	1.78	0.33	col 3	1.81	0.35
col 4	1.80	0.36	col 4	1.79	0.36
col 5	1.75	0.33	col 5	1.78	0.33
col 6	1.74	0.29	col 6	1.79	0.36
col 7	1.73	0.26	col 7	1.73	0.35
col 8	1.80	0.28	col 8	1.84	0.36
col 9	1.81	0.30	col 9	1.80	0.33
col 10	1.74	0.31	col 10	1.74	0.38

O tamanho do guarda não teve influência na agressividade contra um intruso heteroespecífico. Verificamos que 31% das abelhas *F. varia* introduzidas não foram atacadas, provavelmente porque não são uma ameaça para *T. angustula*. Encontramos ainda que as colônias com guardas maiores não eram mais propensas a atacar os invasores de *F. varia* (GLMM: valor $z = 1,06$, $p = 0,29$).

Foi verificada uma correlação positiva significativa entre a largura da cabeça e a superfície estimada das antenas ($p = 0,84$, $N = 14$, $p = 0,0003$; figura 2c). Além disso, houve uma relação positiva entre a largura da cabeça dos guardas e o número estimado de placas de poros ($p = 0,56$; $N = 14$; $p = 0,042$; figura 2d), mas não houve relação significativa entre a largura da cabeça e a densidade de poros na placa ($p = -0.11$, $p = 0.71$).

5. DISCUSSÃO

A defesa dos recursos acumulados em ninhos de insetos sociais quando realizadas por indivíduos especialista nesta tarefa (guardas) aumentam as chances de sobrevivência de uma colônia (Giron *et al.* 2007, Powell 2009, Grüter *et al.* 2012, Kamiya & Poulin 2013, Segers *et al.* 2016). Tendo em vista as pressões de competição, por recursos e local de nidificação e de predação, a eficiência nesta proteção pode ser crucial na manutenção da espécie (Husseneder 1997, Sakagami *et al.* 1993), onde características morfológicas especializadas para defesa como glândulas de veneno, ferrão ou um exoesqueleto mais rígido, promovem vantagens evolutivas (Oster & Wilson 1978, Yamamura 1993, Queller & Strassmann 1998).

O primeiro desafio para as guardas é reconhecer se os indivíduos que se aproximam da entrada do ninho representam uma ameaça, especialmente se estes são visualmente menos discerníveis (Couvillon *et al.* 2009). Ao apresentar iscas que não são possíveis predadores temos a intenção de testar se as guardas reagiriam da mesma maneira tanto para indivíduos ameaçadores quanto aqueles que não o são, assim testando se o comportamento de defesa evoluiu para inimigos específicos ou se elas se defendem à aproximação de um indivíduo qualquer.

Segundo Bowden *et al.* (1994) e Wittmann *et al.* (1990) as guardas voadoras (GV) identificam ameaças por odores voláteis e estímulos visuais, no entanto, as guardas fixas (GF) precisam tatear o indivíduo para reconhecê-lo. As guardas voadoras de *Tetragonisca angustula* desempenham um papel importante na capacidade de detecção de intrusos a maiores distâncias (van Zweden *et al.* 2011), quando comparada a outras espécies que tem apenas guardas fixas, como *Plebeia doryana*, *Frieseomelitta varia*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Melipona quadrifasciata* (van Zweden *et al.* 2011), assim como quando comparadas colônias com número de GV desiguais, onde, colônias com mais guardas detectam intrusos antecipadamente. Os experimentos realizados por van Zweden *et al.* (2011) mostraram que para a espécie *T. angustula* o ataque ao modelo de teste (*L. limao*) acontece em 90% das vezes antes de alcançar a entrada (~20 cm), já para outras espécies de Meliponini essa proporção foi de apenas 4% (1 a 3 cm), apenas *F.*

varia atacou de 13 a 6 cm da entrada em 2 testes dos 20 realizados (van Zweden *et al.* 2011).

Os resultados apresentados nesse estudo mostram que os dois tipos de guardas, voadoras e fixas, encontradas em *Tetragonisca angustula*, possuem mecanismos e estratégias distintas de respostas comportamentais que são complementares umas às outras e aumentam a eficiência da defesa da colônia contra inimigos potenciais. Essas respostas são adaptativas nessas abelhas, visto que várias espécies são conhecidas por furtar recursos de outras. Estas espécies normalmente apresentam coloração escura, como o inimigo natural de *T. angustula*, *Lestrimelitta limao*, uma abelha cleptoparasítica obrigatória que invade ninhos de dezenas de outras espécies de abelhas sem ferrão para coletar o mel, pólen e prole (Wittmann 1985; Roubik 1989).

Bowden *et al.* (1994) estudaram que as guardas de *T. angustula* rejeitam 70 vezes mais inimigos de cor preta que ameaças de cor amarela, e atacaram duas vezes mais modelos plásticos tratados com odores cefálicos de *Scaptotrigona mexicana* em comparação com controle. Mesmo com cores e morfologia semelhantes a abelha parasita obrigatória *Lestrimelitta limao*, a aproximação de *Scaptotrigona* aff. *depilis* provocou respostas comportamentais semelhantes aquelas apresentadas aos testes com o intruso *Trachipus buharti*, porém a defesa a *L. limao* foi expressivamente mais intensa.

A espécie aqui empregada como modelo de estudo, *T. angustula*, reconhece substâncias químicas produzidas por um intruso como cairomônios (Wittmann *et al.* 1990). O composto nomeado citral (mistura dos isômeros neral e geranial), um volátil com odor semelhante ao limão, liberado pelas operárias da abelha parasita social obrigatória *Lestrimelitta limao* (conforme Wittmann *et al.* 1985, 1990, Sakagami *et al.* 1993), quando presente, causa grande resposta defensiva/agressiva, com aumento do número de guardas (Wittmann *et al.* 1990, Kärcher & Ratnieks 2009) e a quantidade de ataques ao intruso (Grüter *et al.* 2017). Esse mecanismo de defesa ativa gera combates e consequente morte de centenas de indivíduos da espécie ladra e da espécie hospedeira (Cunningham *et al.* 2014, Sakagami *et al.* 1993). O mesmo comportamento é reportado em algumas abelhas sem ferrão nativas da Austrália, *Tetragonula carbonaria* e *Tetragonula hockingsi* (Cunningham *et al.* 2014).

Conforme o observado durante as apresentações de *L. limao*, supomos que a maior parte dos indivíduos recrutados vieram de dentro do ninho, porém não é possível ter certeza (pois os indivíduos não estão marcados, além disso, muitas vezes observamos GF entrando e saindo do tubo). A maioria das GF permaneceram pousadas, porém agitadas/caminhando e sinalizando. Após a remoção da isca observamos que as GV se dispersam, ficando mais distantes do tubo de entrada, de 30 a 50cm. Ao mesmo tempo muitas guardas se movem como em vigilância próximo ao chão.

Conforme Blum *et al.* (1970), outras espécies de Meliponini também respondem a presença deste composto (cital), além de estratégias particulares para defesa o ninho contra estas abelhas parasitas sociais obrigatórias, *L. limao* (Kerr & de Lello 1962). Como por exemplo, bloqueando a estreita entrada da colônia com apenas uma guarda, em *Melipona quadrifasciata* e *Frieseomelitta varia*. Em adição, *M. quadrifasciata*, assim como *T. angustula*, recrutaram operárias do interior do ninho atacando os indivíduos de *L. limao* (Bego *et al.* 1991), e *F. varia* parecem estar geralmente isentos de invasões de *L. limao* (Bego *et al.* 1991), possivelmente devido ao uso intensivo de resina pegajosa, uma substância utilizada para defesa (Patricio *et al.* 2002). As espécies *Plebeia droryana* e *Nannotrigona testaceicornis*, parecem indefesas quando atacadas, conseqüentemente se tornam alvos preferenciais de *L. limao* (Sakagami *et al.* 1993) independentemente de *N. testaceicornis* investir na quantidade de guardas de entrada (Couvillon *et al.* 2008) e de *P. droryana* utilize resina em sua defesa (Patricio *et al.* 2002).

De acordo com Bego *et al.* (1991) *F. varia* não é um alvo frequente de roubos por *L. limao*, o que pode estar relacionado ao uso de uma resina pegajosa para sua defesa, atacando os inimigos e fechamento da entrada da colônia (Patricio *et al.* 2002, von Zuben 2012). Alguns estudos demostram ainda uma preferência de ataques a ninhos do gênero *Plebeia*, que assim como *F. varia*, utiliza resina para defesa, e gênero *Nannotrigona* que investe na quantidade de guardas (Sakagami *et al.* 1993, Roubik 1989, Patricio *et al.* 2002) semelhante ao que observado em *T. angustula* (Couvillon *et al.* 2008).

As guardas apresentaram intensa agitação à exposição ao composto citral (mistura dos isômeros neral e geranial), um volátil com odor semelhante ao limão, liberado pelas operárias desta abelha parasita obrigatória (Wittmann *et al.* 1990). De acordo com Blum (1969), a maioria das espécies da subfamília Mirmicinae, como *Atta* e *Acromyrmex*, produzem secreções (mistura de compostos) relacionadas à comunicação ou alarme em sua glândula mandibular). A formiga cortadeira *Atta sexdens* apresenta isômeros deste

composto em secreção produzida pela sua glândula mandibular. Observamos que mesmo apresentando este composto as respostas agressivas a esta espécie-isca, *A. sexdens*, foram pequenas comparadas à *L. limao*. Adicionalmente, as GF exibiram mais respostas que as GV na aproximação desta isca. As respostas apresentadas para os intrusos de cores e morfologia diferentes dos coespecíficos sugerem que as GF têm a capacidade de reconhecimento semelhante a demonstra por GV.

Nossos resultados corroboram que *Lestrimelitta limao* é o inimigo que elicia uma resposta singular à entrada da colônia, provocando o recrutamento de dezenas de indivíduos do interior do ninho. Portanto, estes sinais interespecíficos servem de instrumento de manipulação, promovendo uma corrida armamentista entre resistência e persuasão, predador presa, emissor e receptor (Krebs & Davies 1996), referindo ao processo de coevolução. Este termo consiste em “mudanças genéticas recíprocas de espécies que interatuam devido a seleção natural imposta uma sobre a outra” (Futuyma 1998), com a premissa que houve interação interespecífica dos ancestrais, exercendo forças seletivas um sobre o outro promovendo modificações nas duas formas, espécies ou características atuais (Becerra 1999, Thompson & Oldroyd 2004).

Através da matriz de frequência é possível observar padrões, comparando os dois fenótipos comportamentais de guardas. As GF executaram os comportamentos registrados com maior frequência quando o intruso é apresentado caminhando, com exceção da sinalização e conturbação que foram registrados para todas as espécies iscas. O oposto é observado para as GV, onde os comportamentos foram exibidos com o modelo de apresentação voando. Verificamos ainda que as GF desempenham uma variedade e frequência maior de comportamento quando é confrontada com intrusos com potencial ameaça à colônia.

Durante a apresentação é possível observar que os comportamentos de sinalização e conturbação são semelhantes para as iscas ápteras, com exceção de Controle em que em 90% dos testes ambos GF e GV foram indiferentes a presença da isca. *Acromirmex subterraneum*, assim como as outras iscas ápteras, foi apresentado apenas caminhando. Este espécime não representa uma ameaça a colônia, entretanto é de cor escura e morfologia distinta. Mesmo com estas características, raramente as GF se aproximaram do intruso, isto pode indicar que as guardas conseguem distinguir intrusos que são uma ameaça a colônia ou não.

Apesar de as GV serem uma grande vantagem evolutiva quando relacionado ao ataque de abelhas ladras, quando pensamos em predadores de emboscada, como as aranhas saltadoras, esta característica comportamental pode ser uma vulnerabilidade. Quando comparamos as repostas exibidas na presença da aranha (*Menemerus* sp.) e a formiga açucareira (*Camponotus* sp.) observamos grande distinção. Observamos que durante a apresentação deste tipo de predador as GV se afastam da entrada. Simultaneamente as GF, na maioria das vezes, se movimentam para o lado oposto do tubo, revelando uma estratégia de defesa ainda não conhecida. O movimento é executado em grupo, porém não podemos afirmar se há alguma pista química de comunicação entre as guardas, pois pode ser consequência de autopreservação individual realizada ao mesmo tempo.

Shackleton *et al.* (2018) mostraram uma estratégia utilizadas por abelhas do gênero *Partamona* (*Partamona helleri*) quando enfrentam predadores próximos a entrada da colônia. Foi descrito que estes indivíduos, ao retornarem para o ninho, aumentam a velocidade ao se aproximar do tubo, isso é possível pela grande abertura estrutural e adaptação para impacto. Isto reduz a probabilidade de predação e perda de abelhas e alimento (pólen ou néctar) coletados por ela. *T. angustula* e outras espécies, como *Plebeia doryana* e *Friseomelitta varia*, utilizam uma resina pegajosa no tubo de entrada para defesa contra invasores que se aproximam caminhando, como formigas predadoras ou açucareiras (Gastauer *et al.* 2011). Um detalhe intrigante é a evasão rápida e intensa das GF quando aproximamos a formiga açucareira. É possível que esta espécie invada o ninho de Meliponini em busca de fontes de alimento açucarado, porém não representaria uma ameaça aos indivíduos de *T. angustula*. São necessários mais estudos com esta interação para compreendermos se existe alguma pista química utilizada por *Camponotus* sp. durante uma invasão que provocando a resposta descrita.

As GV de *T. angustula* desempenham um papel importante na capacidade de detecção de intrusos a maiores distâncias (van Zweden *et al.* 2011). Ainda assim, se um intruso passar pela primeira frente de defesa (GV) confrontará uma nova barreira, mais consistente e melhor distribuído GF. Kärcher & Ratnieks (2009) relatam que é possível ocorrer uma pequena proporção de troca de tarefas entre GV e GF, quando oferecidos odores de outras espécies, mas não há uma divisão de trabalho consistente (visto também por Ratnieks & Anderson, 1999), descrevem ainda que as GF mantém maior tempo na mesma posição, no entanto a presença de intrusos pode causar o início de voo por estes

indivíduos (Kärcher & Ratnieks 2009) mas nada comparável com a presença de *L. limao*, em que o recrutamento deriva de dentro do ninho (Wittmann 1985, Wittmann *et al.* 1990).

A produção de guardas promove melhor desempenho na proteção da colônia, o que, conseqüentemente, aumenta a probabilidade de sua sobrevivência (Giron *et al.* 2007, Powell 2009, Grüter *et al.* 2012, Kamiya & Poulin 2013). Por outro lado, o custo de produção de subcastas especializadas é alto e pode reduzir o investimento ligado a reprodução (e.g., Stern & Foster 1996, Harvey *et al.* 2000, Kamiya e Poulin 2013, Chouvenc *et al.* 2015). Strickland *et al.* (2018) utilizou o modelo de defesa das guardas de *T. angustula* em simulações teóricas, buscando verificar a quantidade ideal de GF e/ou GV para defender sua colônia de intrusos com níveis diferentes de “perigo”, levando em consideração a energia gasta para manutenção do indivíduo e para iniciar o ataque, descontando do valor energético original da “colônia”.

A interação entre a quantidade de guardas de *T. angustula* presentes na entrada do ninho e a distância de detecção de indivíduos de *L. limao* (espécie cleptobiótica (Silveira *et al.* 2002)) é positivamente correlacionada, ou seja, quanto maior o número de guardas presentes na entrada, maior é a distância de reconhecimento e ataque (van Zweden *et al.* 2011). Segundo Couvillon *et al.* (2008) existe correlação entre o comprimento do tubo e o número de operárias pousadas na superfície externa. Além disso, a quantidade de guardas de uma colônia pode estar relacionada com a saúde, idade ou números de indivíduos total da colônia (Segers *et al.* 2016). Yang *et al.* (2004) sugere que esta diferença no número de guardas poderia ser resposta à uma adaptação local, dependendo do tipo de ameaças que a colônia é exposta.

Um número maior de guardas equivale a um investimento maior em defesa, o que equivale a uma tarefa relativamente perigosa (Penney & Gabriel 2009) e dispendiosa energeticamente (pairando e abanando as asas), somada a impossibilidade de realizar outras tarefas (Segers *et al.* 2016). No entanto, quanto mais especializado um indivíduo é para realizar determinada tarefa, menor é a quantidade necessária para suprir sua demanda, seja de proteção (com número de guardas) ou forrageio, por exemplo (Wilson 1984; Hölldobler & Wilson 2009). Adicionalmente, a evolução da especialização entre operárias (subcastas especializadas) promove maior eficiência na divisão de trabalho (Oster & Wilson, 1978; Hölldobler & Wilson, 2009).

A determinação das características morfológicas das guardas/soldados podem estar relacionada a fatores nutricionais, sendo um deles a quantidade de alimento recebido entre as larvas, bem como a posição da célula em que a larva se encontra (células de cria centrais de um favo tem maior probabilidade de emergirem guardas, Segers *et al.* 2015). Uma operária de *T. angustula* precisa de aproximadamente 5 a 6 semanas do ovo até a eclosão (Segers *et al.* 2015). Após a eclosão, segue-se um período de maturação comportamental (cuidando ou construindo células de cria) de aproximadamente duas semanas, conseqüentemente, o número de guardas que protegem ativamente a entrada da colônia não é igual ao número total de guardas em uma colônia (Hammel *et al.* 2016). Assim, uma nova geração de guardas pode ser criada em sete a oito semanas.

Tendo em vista que a origem de uma nova geração de guardas em maior quantidade pode levar várias semanas (Segers *et al.* 2015), manter indivíduos “reserva” provavelmente reduziria o consumo de energia (alimento), conseqüentemente alimentaria a resiliência da colônia (Penney & Gabriel 2009) podendo ser parte do processo de seleção natural. Uma reserva de soldados poderia levar a um sistema social resistente, que deveria evoluir quando o ambiente biótico contém ameaças potencialmente catastróficas (Segers *et al.* 2016).

Segers *et al.* (2016), demonstraram que colônias que não estão expostas a ameaças podem apresentar menor quantidade de guardas em sua entrada. Característica que corrobora com a teoria de eficiência ergonômica (Oster & Wilson, 1978). Mesmo com exposições frequentes dos indivíduos-isca às colônias a quantidade média de guardas antes dos experimentos foi estável durante todo o período de testes. Os soldados de *T. angustula* guardam uma média de 5-6 dias (Grüter *et al.* 2011), mas podem apresentar o que é chamado de “persistência individual a longo prazo”, manifestando o comportamento de vigilância por até 20 dias (Grüter *et al.* 2011). Em abelhas europeias (*Apis mellifera*) é observado que apenas uma pequena porção de operárias apresentam esse comportamento, geralmente durando menos de um dia (Moore *et al.* 1987), no máximo de 6-7 dias (Moore *et al.* 1987, Hunt *et al.* 2007).

Estudos com outras espécies de abelhas revelam que o tamanho corporal é uma variável determinante (Chittka & Niven 2009, Spaethe *et al.* 2007) na capacidade sensorial, por proporcionar uma superfície maior para sensilas quimiorreceptoras nas

antenas (Gill 2013). Em ambientes competitivos uma taxa menor de erros de reconhecimento pode atuar como pressão seletiva para guardas maiores, mantendo as reservas energéticas da colônia e promovendo a produção de operárias maiores. Adicionalmente, guardas maiores são mais eficientes e resistem por mais tempo em batalhas contra os intrusos testados (Grüter *et al.* 2012), promovendo maior proteção para a colônia. Nossos dados sugerem que soldados maiores cometem menos erros de reconhecimento quando confrontados com não-companheiros de ninho. A colônia com as menores guardas apresentaram um erro 10 vezes maior (20,3%) do que a colônia com guardas maiores (1,9%). Este efeito foi encontrado tanto para o primeiro guarda a entrar em contato com um intruso, quanto com o desempenho coletivo dos guardas. Porém o tamanho da guarda não influenciou a aceitação dos companheiros de ninho.

Estudos sobre o efeito do tamanho do indivíduo e a velocidade de transição entre as tarefas foram realizados para Bombini (Yerushalmi *et al.* 2006) e Apini (Kerr & Hebling 1964). Em algumas abelhas sem ferrão e em *Apis mellifera*, as tarefas de guarda precedem as atividades de forrageamento, (Robinson 1992, Sakagami 1982, Hammel *et al.* 2016), no entanto a variação no tamanho dessas operárias é pequena (Seeley 1982; Johnson 2003). Grosso & Bego (2002) observaram que as guardas de *T. angustula* avançam ligeiramente mais rápido entre as tarefas que as operárias, (média: 2 dias mais nova), essa diferença é encontrada principalmente nas duas primeiras semanas pós-emergência (Hammel *et al.* 2016). Além disso, as guardas realizam mais tarefas durante sua vida (40,7%) e tem maior repertório de comportamentos (34%) quando comparado às operárias que não guardam a entrada (Hammel *et al.* 2016).

Conforme estudado por Grüter *et al.* (2012) em *T. angustula*, as guardas maiores são mais eficientes e resistem por mais tempo em batalhas contra os intrusos testados e as pernas maiores podem ainda auxiliar a segurá-los (Grüter *et al.* 2012). Ao contrário do que ocorre em muitas formigas, as guardas de Jataí usam suas mandíbulas não para cortar ou esmagar um inimigo, mas sim para se agarrar e manter a posição (Sakagami 1982; Nunes *et al.* 2014). Assim, elas podem não precisar de cabeças maiores para acomodar poderosos músculos da mandíbula (Grüter *et al.* 2012), que melhora a performance defensiva em formigas dos gêneros *Pheidole* e *Atta* (Oster e Wilson 1978, Hölldobler & Wilson 2009, 1990).

As guardas de *T. angustula* tem uma impressionante capacidade de reconhecimento de companheiras de ninho e intrusos, aceitando, em média, 100% das companheiras de ninho e rejeitando 92% das não companheiras (Kärcher & Ratnieks 2009, Jones *et al.* 2012). Esta taxa é maior do que a observada em abelhas melíferas ou em outras abelhas sem ferrão. Em *Apis mellifera*, a maior diferença na rejeição vista por Downs e Ratnieks (2000) foi de 55% (20% para companheiras e de 75% para não companheiras de ninho) e 63% e 65% entre companheiras e não companheiras de ninho, relacionadas e não relacionadas, respectivamente (Ratnieks 1999). Em *Frieseomelitta varia* a diferença foi de 62%, com 11% de rejeição de companheiras de ninho contra 73% para não companheiras (Couvillon & Ratnieks 2009).

Conectando o descrito para Bombini, que a guarda maior tem mais capacidade para identificar um intruso por terem mais sensilas antenais, com o fato de o composto citral provocar respostas em diferentes espécies de Meliponini, sendo a de *T. angustula* mais pronunciada, recrutando uma grande quantidade de indivíduos de dentro da colônia, somado a presença de GV, que promovem identificação o intruso a uma distância maior, também que guardas maiores são mais eficientes em batalhas, é provável que esses fatores atuem em conjunto, reduzindo a possibilidade de retorno de uma batedora a sua colônia de origem e consequente ataque a hospedeira. Assim, guardas maiores têm mais sensilas antenais, o que provavelmente melhoraria a percepção sensorial, portanto, guardas maiores são melhores em reconhecer invasores coespecíficos. Isso, por sua vez, poderia ajudar a explicar a evolução/surgimento de guardas maiores em abelhas sem ferrão. Pode ser que o tamanho da guarda seja uma consequência, não a causa da precisão do reconhecimento. Mas indivíduos maiores não apresentam maior agressividade, não encontramos associação entre o tamanho da guarda e a probabilidade de atacar uma abelha heteroespecífica fácil de reconhecer (*F. varia*). Portanto, sugerimos que o próprio tamanho da guarda afeta o reconhecimento.

6. CONCLUSÃO

As guardas apresentam respostas distintas sobre o intruso e o modo de apresentação. Iscas aladas quando apresentadas caminhando provocam maior frequência de respostas agressivas das Guardas Fixas, já as Guardas Voadoras responderam quando estes intrusos eram apresentados caminhando

A presença de *Lestrimelitta limao* gerou maior flutuação do número de guardas, com alta proporção de recrutamento das Guardas Voadoras e respostas agressivas de ambas, sugerindo especialização.

As respostas apresentadas para os intrusos de cores e morfologia diferentes dos coespecíficos sugerem que as GF têm a capacidade de reconhecimento e semelhante a demonstrada por GV.

Podemos inferir que se formaram 5 grupos referentes a interação destes componentes, com exceção de lima caminha GF e lima voa GV, que se apresentam isoladas.

- Controles e *Acromyrmex subterraneus* (GF e GV), *Scaptotrigona* aff. *depilis* (caminha GV), unidas pelo comportamento de indiferença;
- *Camponotus* sp., *Menemerus* sp. (Aranha), *Atta sexdens*, *Lestrimelitta limao* (voa GF), respostas defensivas;
- *Trachipus buharti* (Vespa) e *S. depilis* (caminha GF), respostas de alarme e defesa
- *T. buharti* e *L. limao* (caminhando GF), *T. buharti* e *S. depilis* (Voando GV), respostas agressivas;
- *Camponotus* sp., *A. sexdens*, *Menemerus* sp. (GV) e *T. buharti* e *S. depilis* (voando GF), indiferença e defesa.

O tamanho da guarda influencia na área de superfície das antenas, assim como quantidade de sensilas, mas não a densidade. Guardas maiores cometem menos erros de aceitação ou rejeição de coespecíficos, mas não reflete na probabilidade de agressão a heteroespecíficos.

7. REFERÊNCIAS

- Baccaro, B.B. Feitosa, R.M.; Fernandez, F.; Fernandes, I.O.; Izzo, T.J.; Souza, J.L. P. de; Solar, R. Guia para generos de formigas no Brasil. 1 ed. Manaus: INPA. 2015. 388p.
- Balbuena, M.S., González, A. & Farina, W.M. Apidologie (2018) 49: 185.
<https://doi.org/10.1007/s13592-017-0539-x>
- Barth, F.G.; Hrncir, M.; Jarau, S. 2008. Signals and cues in the recruitment behavior of stingless bees (Meliponini). Journal of Comparative Physiology A, 194: 313-327.
- Batista, M.A., Ramalho, M. and Soares, A.E.E. (2003) Nesting sites and abundance of Meliponini (Hymenoptera: Apidae) in heterogeneous habitats of the Atlantic Rain Forest. *Lundiana*, 4, 19–23.
- Becerra, J. X., and D. L. Venable. 1999. Macroevolution of insect-plant associations: the relevance of host biogeography to host affiliation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:12626–12631.
- Bego L R, Zucchi R, Mateus S. 1991. Notas sobre a estratégia alimentar (cleptobiose) de *Lestrimelitta limao* Smith (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Naturalia*, 16:119-127.
- Blum, M S (1966) Chemical Releasers of Social Behaviour. VIII. Citral in the Mandibular Gland Secretion of *Lestrimelitta limao* (Hymenoptera: Apoidea: Melittidae). *Annals of the Entomological Society of America* 59: 962-964.
- Bourke AF. The validity and value of inclusive fitness theory. *Proc R Soc B*. 2011;278:3313–20.
- Bowden RM, Garry MF, Breed MD (1994) Discrimination of con- and heterospecific bees by *Trigona (Tetragonisca) angustula* guards. *J Kans Entomol Soc* 67: 137-139.
- Braga JA, Sales EO, Neto JS, Conde MM, Barth OM, Lorenzon MC (2012) Floral sources to *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae) and their pollen morphology in a Southeastern Brazilian Atl
- Branstetter MG, Danforth BN, Pitts JP, Faircloth BC, Ward PS, Buffington ML, Gates MW, Kula RR, Brady SG. Phylogenomic Insights into the Evolution of Stinging Wasps and the Origins of Ants and Bees. *Curr Biol*. 2017 Apr 3;27(7):1019-1025. doi: 10.1016/j.cub.2017.03.027.
- Butler CG, Free JB (1952). The behaviour of worker honeybees at the hive entrance. *Behaviour* 4: 263-291.
- Camargo J. M. F.; Pedro, S. R. de M. 2008. Revisão das espécies de *Melipona* do grupo fuliginosa (Hymenoptera, Apoidea, Apidae, Meliponini). *Revista Brasileira de Entomologia*. 52(3): 411-427.
- Camargo, R.C.R.; Pereira, F.M.; Lopes, M.T.R. Produção de mel. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 138 p.
- Cameron SA (2004) Phylogeny and biology of neotropical orchid bees (Euglossini). *Annu Rev Entomol* 49: 377–404.

- Cardinal S, Danforth BN. Bees diversified in the age of eudicots. *Proc R Soc.* 2013;280 (1755): 20122686.
- Cardinal S, Danforth BN. The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. *PLoS One.* 2011;6:e21086.
- Chapman, R. F. (Reginald Frederick). *The insects: structure and function* / R. F. Chapman. – 5th edition (2013)/ edited by Stephen J. Simpson, Angela E. Douglas. © Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-11389-2.
- Chittka L., Niven J. 2009 Are bigger brains better? *Curr. Biol.* 19, R995-R1008.
- Chouvenc, T., M. Basille, and N. Y. Su. 2015. The production of soldiers and the maintenance of caste proportions delay the growth of termite incipient colonies. *Insectes Sociaux* 62:23–29.
- Costa, M.A.; Del Lama, M.A.; Melo, G.A.R.; Sheppard, W.S. 2003. Molecular phylogeny of the stingless bees (Apidae, Apinae, Meliponini) inferred from mitochondrial 16S rDNA sequences. *Apidologie.* 34: 73–84.
- Couvillon, M J; Kärcher, M; Russell, T E; Endsor, S; Caple, J P; Storey, D E; Ratnieks, F L W (2007) Nestmate recognition template of guard honey bees is changed by wax comb transfer. *Biology Letters* 3: 228-230.
- Couvillon, M. J., Robinson, E. J. H., Atkinson, B., Child, L., Dent, K. R. and Ratnieks, F. L. W. (2008). En garde: rapid shifts in honey bee (*Apis mellifera*) guarding behavior is triggered by onslaught of conspecific intruders. *Anim. Behav.* 76, 1653-1658.
- Couvillon, M.J., Wenseleers, T., Imperatriz-Fonseca, V.L., Nogueira- Neto, P. & Ratnieks, F.L.W. (2008). Comparative study in stingless bees (Meliponini) demonstrates that nest entrance size predicts traffic and defensivity. *J. Evolution. Biol.* 21: 194-201. doi: 10.1111/j.1420- 9101.2007.01457.x
- Couvillon MJ, Ratnieks FLW (2009) Odour transfer in stingless bee marmelada (*Frieseomelitta varia*) demonstrates that entrance guards use an Bundesirable-absent^ recognition system. *Behav Ecol Sociobiol* 62:1099–1105
- Couvillon M.J., Segers F.H.I.D., Cooper-Bowman R., Truslove G., Nascimento D.L., Nascimento F.S., Ratnieks F.L.W. 2013 Context affects nestmate recognition errors in honey bees and stingless bees. *Journal of Experimental Biology* 216, 3055-3061.
- Cunningham, John Paul, James P. Hereward, Tim A. Heard, Paul J. De Barro, and Stuart A. West. Bees at War: Interspecific Battles and Nest Usurpation in Stingless Bees. *Am. Nat.* 2014. Vol. 184, no.6. 2014.
- Danforth BN, Cardinal S, Praz C, Almeida EA, Michez D. (2013). The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annu Rev Entomol.* 2013;58:57–78.
- Danforth BN, Fang J, Sipes S (2006). Analysis of family-level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes: CAD and RNA polymerase II. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, 358–372.
- Danforth BN, Poinar GO. (2011). Morphology, classification, and antiquity of *Melittosphech burmensis* (Apoidea: Melittosphecidae) and implications for early bee evolution. *J Paleontol.* 2011;85:882–91.

- DeGrandi-Hoffman G, Collins AM, Martin JH, Schmidt JO & Spangler HG (1998) Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior* 11: 37–45.
- Della Lucia, T. M. C., Vilela, E. F., And Moreira, D. D. O. 2001. Feromônios de formigas cortadeiras, pp. 73–82, in E. F. Vilela and T. M. C. Della Lucia (eds.). *Feromônios de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas*. Holos, Ribeirao Preto, Sao
- Dias, Camila Calixto Moreira. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites de *Scaptotrigona aff. depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Ribeirão preto 2011. Dissertação de mestrado – Orientador Ademilson espencer egea soares.
- Do Nascimento, R. R., Morgan, E. D., Billen, J., Schoeters, E., Della Lucia, T. M. C., and Bento, J. M. 1993. Variation with the caste of the mandibular gland secretion in the leafcutting ant *Atta sexdens* rubropilosa. *J. Chem. Ecol.* 19:907–918.
- Downs, Stephen G. and Ratnieks, Francis L. W. (2000). Adaptive shifts in honey bee (*Apis mellifera* L.) guarding behavior support predictions of the acceptance threshold model. *Behavioral Ecology* Vol. 11 No. 3: 326–333
- Ehrlich, P. R., and P. H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18:586–608.
- Engel MS (2001). A monograph of the Baltic amber bees and evolution of the Apoidea (Hymenoptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 259:1–192.
- Fialho, M.C.Q, C.P. Guss-Matiello, J.C. Zanuncio, L.A.O. Campos and J.E. Serrão. A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. *Journal of Apicultural Research* 53(3): 392-403 (2014). DOI 10.3896/IBRA.1.53.3.07
- Francelino M.R., Mendonça A.L., Do Nascimento R.R. and Santana A.E.G. 2006. The mandibular gland secretions of the leaf-cutting ants *Atta sexdens* *sexdens* and *Atta opaciceps* exhibit intercaste and intercolony variations. *J. Chem. Ecol.* 32: 643–656.
- Freitas G.S. 2001 Levantamento de ninhos de meliponíneos (Hymenoptera, Apidae) em área urbana: Campus da USP, Ribeirao Preto-SP [Master Thesis], University of Sao Paulo.
- Gill K.P., Van Wilgenburg E., Macmillan D.L., Elgar M.A. 2013 Density of antennal sensilla efficacy of communication in a social insect. *Am. Nat.* 182, 834-840.
- Giron D, Ross KG, Strand MR. Presence of soldier larvae determines the outcome of competition in a polyembryonic wasp. *J Evol Biol.* 2007; 20(1): 165-72.
- Gottsberger G. and Silberbauer-Gottsberger, 1998. Life in the Cerrado: a South American Tropical Seasonal Ecosystem. Vol. II. Pollination and Seed Dispersal. - Reta, Ulm, 383 pages.
- Grimaldi D (1999). The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86:373–406.
- Grimaldi D and Engel MS (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, New York. ISBN: 9780521821490.
- Grosso AF, Bego LR (2002) Labor division, average life span, survival curve, and nest architecture of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Sociobiology* 40: 615-637.

- Grüter C, Segers FH, Menezes C, Vollet-Neto A, Falcón T, von Zuben L, Bitondi MM, Nascimento FS, Almeida EA. Repeated evolution of soldier sub-castes suggests parasitism drives social complexity in stingless bees. *Nat Commun.* 2017 Dec;8(1):4.
- Grüter, C., von Zuben, L., Segers, F. & Cunningham, J. Warfare in Stingless bees. *Insectes Soc.* 63, 223–236 (2016).
- Grüter C., Kärcher M., Ratnieks F.L.W. 2011 The natural history of nest defence in a stingless bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with two distinct types of entrance guards. *Neotropical Entomology* 40, 55-61.
- Grüter C., Menezes C., Imperatriz-Fonseca V.L., Ratnieks F.L.W. 2012 A morphologically specialized soldier caste improves colony defence in a Neotropical eusocial bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1182-1186.
- Hammel B., Vollet-Neto A., Menezes C., Nascimento F.S., Engels W., Grüter C. 2016 Soldiers in a stingless bee: work rate and task repertoire suggest guards are an elite force. *Am. Nat.* 187, 120-129.
- Harvey, J. A., L. S. Corley, and M. R. Strand. 2000. Competition induces adaptive shifts in caste ratios of a polyembryonic wasp. *Nature* 406:183–186.
- Hölldobler B, Wilson E.O. (2009) *The Superorganism: The beauty, elegance, and strangeness of insect societies*. New York, W. W. Norton & Company, 522p.
- Hölldobler, B.; Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, 732 pp.
- Hunt, G.J. (2007). Flight and fight. *Journal of Insect Physiology* 53, 399–410.
- Husseneder C, Kaib M, Epplen C, Epplen J, Brandl R. Small scale population structure of the termite *Schedorhinotermes lamanianus*: aggression modulated by genetic and environmental factors. *Mitt Dtsch Gesell Allg Angew Ent.* 1997; 11: 183-7
- Ihering, Rodolfo (1933). Criando a abelha brasileira jatahy. *Chácaras E Quintais* v.47: p.456-457.
- Johnson L.K. (1983) Foraging strategies and the structure of stingless bee communities in Costa Rica, in: Jaisson P. (Ed.), *Social Insects in the Tropics* 2, Université Paris-Nord, Paris, pp. 31-58.
- Johnson, B.R., Borowiec, M.L., Chiu, J.C., Lee, E.K., Atallah, J., and Ward, P.S. (2013). Phylogenomics resolves evolutionary relationships among ants, bees, and wasps. *Curr. Biol.* 23, 1–5. doi:10.1016/j.cub.2013.08.050.
- Jones S.M., van Zweden J.S., Grüter C., Menezes C., Alves D., Nunes-Silva P., Czaczkas T.J., Imperatriz-Fonseca V.L., Ratnieks F.L.W. 2012 The role of wax and resin in the nestmate recognition system of a stingless bee, *Tetragonisca angustula*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66, 1-12.
- Kamiya T, O'Dwyer K, Nuy J, Poulin R. What determines the growth of individual castes in social trematodes? *Evol Ecol.* 2013; 27: 1235-47.
- Kärcher M., Ratnieks F.L.W. 2009 Standing and hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* complement each other in entrance guarding and intruder recognition. *Journal of Apicultural Research* 48, 209-214.

- Kelber A, Zeil J (1997) *Tetragonisca* guard bees interpret expanding and contracting patterns as unintended displacement in space. *J Comp Physiol A Sens Neural Behav Physiol* 181: 257-265.
- Kerr, W. E.; Hebling, N. J. (1964) Influence of the weight of worker bees on division of labor. *Evolution* 18 : 267-270.
- Kerr, W.E.; G.A Carvalho & V.A. Nascimento. 1996. *Abelha urucu: biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte, Ed. Fundação Acangaú, XII+143p.
- Kerr, Warwick E. and de Lello, Edy. Sting Glands in Stingless Bees: A Vestigial Character (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*, Vol. 70, No. 4 (Dec., 1962), pp.190-214
- Kocher SD, Paxton RJ. Comparative methods offer powerful insights into social evolution in bees. *Apidologie*. 2014;45:289–305.
- Koedam, D; Morgan, ED; Nunes, TM; Patrício, EFLRA; Imperatriz-Fonseca, VL. 2010. Selective preying of the sphecid wasp *Trachypus boharti* on the meliponine bee *Scaptotrigona postica*: potential involvement of caste-specific cuticular hydrocarbons. *Physiological Entomology*, DOI: 10.1111/j.1365-3032.2010.00769.x
- Koedam, D; Slaa, EJ; Biesmeijer, JC; Nogueira-Neto, P. 2009. Unsuccessful attacks dominate a drone preying wasp's hunting performance near stingless bee nests. *Genetics Molecular Research* 8: 690-702.
- Krebs, J. R.; Davies, N. B. *Introdução à ecologia comportamental*. 3. ed.1996. São Paulo: Atheneu. 420 p.
- Lewis W. J., Richard L. Jones, H. R. Gross, Jr., And Donald A. Nordlund. The Role of Kairomones and Other Behavioral Chemicals in Host Finding by Parasitic Insects. *Behavioral Biology* 16, 267-289 (1976).
- Marcolino, M.T.; Oliveira-Junior, W.P.; Brandeburgo, M.A.M. Aspectos comportamentais da interação entre formigas *Camponotus atriceps* Smith (Hymenoptera, Formicidae) e abelhas africanizadas *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera, Apidae). *Naturalia*, v.25, p.321-330, 2000.
- Mc Cabe SI, Farina WM (2010) Olfactory learning in the stingless bee *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *J Comp Physiol A* 196(7):481–490
- Menezes C., A. Vollet-Neto, A. J. Marsaioli, D. Zampieri, I. C. Fontoura, A. D. Luchessi, V. L. Imperatriz-Fonseca. A Brazilian Social Bee Must Cultivate Fungus to Survive. *Current Biology* 25, 2851–2855. November 2, 2015. Elsevier Ltd All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.028>
- Michálek O, Petráková L, Pekár S. Capture efficiency and trophic adaptations of a specialist and generalist predator: A comparison. *Ecol Evol* . 2017; 00:1–11.
- Michener, C D. *The Social Behavior of the Bees: A Comparative Study*. Harvard University Press, 1974 - 404 páginas
- Michener, C. D. 2007. *The Bees Of The World*, 2 Edn. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 953p.
- Moore, A.J., Breed, M.D., Moor, M.J. (1987). The guard honey bee: ontogeny and behavioural variability of workers performing a specialized task. *Animal Behaviour* 35, 1159–1167.

- Morse RA, Nowogrodzki R (1990). Honey bee pests, predators, and diseases. Ithaca, New York, Cornell University Press, 474p.
- Moure, J. S. 1951. Notas sobre Meliponinae (Hymenoptera-Apoidea). *Dusenía*, 2(1): 25-70.
- Moure, J.S. 1961. A Preliminary Supra-specific Classification of the Old World Meliponine Bees (Hym., Apoidea). *Studia Entomologica*, 4(1- 4): 181-242.
- Nakagawa S., Schielzeth H. 2013 A general and simple method for obtaining R² from generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution* 4, 133-142.
- Nogueira-Neto, P. (1997). *Vida E Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. São Paulo: Editora Nogueirapis.
- Nunes, T.M., Nascimento, F.S., Turatti, I.C., Lopes, N.P. & Zucchi, R. (2008). Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? *Anim. Behav.* 75:1165- 1171. doi: 0.1016/j.anbehav.2007.08.028
- Oliveira, A.A.; Campos, A.E.C.; Harakava, R. Genetic diversity of urban *Camponotus Mayr* (Hymenoptera: Formicidae) ants revealed by capture of alates and DNA sequencing. *Neotropical Entomology*, v.1, p.1-9, 2017.
- Oliveira, R.C.; Nunes, F.M.F; Campos, A.P.S.; Vasconcelos, S.M.; Roubick, D.; Goulart, L.R.; Kerr, W.E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapd markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 27, n. 2, p. 181-186, 2004.
- Oster, G. & Wilson, E. O. 1978. Caste and ecology in the social insects. Princeton Univ. Press., Princeton, 352pp.
- Patricio, E. F. L. R. A., Cruz-López, L., Maile, R., Tentschert, J., Jones, G. R., & Morgan, E. D. (2002). The propolis of stingless bees: Terpenes from the tibia of three Frieseomelitta species. *Journal of Insect Physiology*, 48, 249–254. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(01\)00170-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(01)00170-6)
- Penney, D., and R. Gabriel. 2009. Feeding behavior of trunk-living jumping spiders (Salticidae) in a coastal primary forest in the Gambia. *Journal of Arachnology* 37:113–115. DOI: 10.1636/ST08-17.1
- Peters RS, Krogmann L, Mayer C, Donath A, Gunkel S, Meusemann K, Kozlov A, Podsiadlowski L, Petersen M, Lanfear R, Diez PA, Heraty J, Kjer KM, Klopstein S, Meier R, Polidori C, Schmitt T, Liu S, Zhou X, Wappler T, Rust J, Misof B, Niehuis O. Evolutionary history of the Hymenoptera. *Curr Biol.* 2017; 27:1013–8.
- Portugal-Araujo, V.D. (1978). Um artefato de defesa em colônias de Meliponineos. *Acta Amaz.*
- Powell, S. (2009). How ecology shapes caste evolution: Linking resource use, morphology, performance and fitness in a superorganism. *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 1004–1013.
- Queller DC, Strassmann JE. Kin selection and social insects. *Bioscience*. 1998; 48(3): 165-75.
- Rangel, griffin and Seeley 2010. Nest site defense by competing honey bee swarms during house-hunting. *Ethology* 608-618.
- Rasmussen, C.; Cameron, S. A. 2007. A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus. *Trigona*. *Systematic Entomology*. 32, 26–39.

- Riveros A.J., Gronenberg W. 2010 Sensory allometry, foraging task specialization and resource exploitation in honeybees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64, 955-966.
- Robinson GE (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol* 37:637–665
- Roubik DW (1989) Ecology and natural history of tropical bees. New York, Cambridge University Press, 514p.
- Roubik, D.W. 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37: 124-143.
- Sakagami S., Roubik D., Zucchi R. (1993). Ethology of the robber stingless bee, *Lestrimelitta limao* (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiol.* 21, 237-277.
- Sakagami S.F. (1982) Stingless bees, in: Herman H.H. (Ed.), *Social insects*, Vol. III, Academic Press, New York, pp. 361–423.
- Sann, M., O. Niehuis, R. S. Peters, C. Mayer, A.. Kozlov5, L. Podsiadlowski, S. Bank, Karen Meusemann, Bernhard Misof, Christoph Bleidorn and Michael Ohl. Phylogenomic analysis of Apoidea sheds new light on the sister group of bees. Sann et al. *BMC Evolutionary Biology* (2018) 18:71 <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1155-8>.
- Schildknecht, H, 1976. Chemical-ecology. A chapter of modern natural products chemistry, *Angew, Chem. Int. ~M. EngL* 15:214-222,
- Schmidt VM, Zucchi R, Barth GF (2003). A stingless bee marks the feeding site in addition to the scent path (*scaptotrigona aff. depilis*). *Apidologie* 34(3): 237-248
- Seeley TD (1995) *The Wisdom of the Hive: the Social Physiology of Honey Bee Colonies*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Seeley, T. D. (1982) Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav Ecol. Sociobiol.* 11 : 287-293
- Segers F.H.I.D., Von Zuben L.G., Grüter C. (2016). Local differences in parasitism and competition shape defensive investment in a polymorphic eusocial bee. *Ecology* 97, 417-426.
- Segers, F. H. I. D., C. Menezes, A. Vollet-Neto, D. Lambert, and C. Grüter. 2015. Soldier production in a stingless bee depends on rearing location and nurse behaviour. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 69:613–623.
- Shackleton, Kyle, Denise A. Alves and Francis L.W. Ratnieks. Organization enhances collective vigilance in the hovering guards of *Tetragonisca angustula* bees. *Behavioral Ecology* (2018), 29(5), 1105–1112. doi:10.1093/beheco/ary086.
- Shanbhag, S R; Müller, B, Steinbrecht, R A (1999) Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster*. 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 28: 377-397. [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7322\(99\)00039-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7322(99)00039-2)
- Sherman, P.W.; Reeve, H. K.; Pfeenig, D. W. 1997. Recognition systems. In: Krebs, J. R.; Davies, N. B. (Eds.) *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*. Blackwell Science, Oxford, 464 pp.
- Silva, L.T.; Pichara, N.L.; Pereira, M.A.; Fiorini, J.E. Formigas como veiculo de patogenos no Hospital Universitario Alzira Velano, em Alfenas – MG. *Revista de Medicina de Minas Gerais*, v.15, n.1, p.13-16, 2005.

- Silveira, F.A., Melo, G.A.R. and Almeida, E.A.B. (2002) *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. Fundação Araucária, Belo Horizonte, MG.
- Smith, C.R.; Toth, A.L.; Suarez A.V.; Robinson, G.E. Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Nature Reviews Genetics* 9, 735-748. 2008.
- Snodgrass, R E (1956) *Anatomy of the honey bee*. Comstock Publishing Association; Ithaca, NY, USA.
- Spaethe J., Brockmann A., Halbig C., Tautz J. 2007 Size determines antennal sensitivity and behavioral threshold to odors in bumblebee workers. *Naturwissenschaften* 94, 733-739.
- Stern, D. L., and W. A. Foster. 1996. The evolution of soldiers in aphids. *Biological Reviews* 71:27–79.
- Suka T, Inoue T (1993) Nestmate recognition of the stingless bee *Trigona (Tetragonula) Minangkabau* (Apidae, Meliponinae).. *J Ethol* 11:141–147
- Team R.C. 2016 R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Thompson, G.J., Oldroyd, B.P., 2004. Evaluating alternative hypotheses for the origin of eusociality in corbiculate bees. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 452–456.
- Tóth E., Queller D.C., Dollin A., Strassmann J.E. 2004 Conflict over male parentage in stingless bees. *Insectes Sociaux* 51, 1-11.
- Van Veen JW, Sommeijer MJ (2000) Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponini). *Insectes Soc* 47: 70-75.
- van Zweden JS, d’Ettorre P (2010) Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons: insect hydrocarbons. Cambridge University Press, Cambridge, pp 222–243
- van Zweden, J. S., C. Grüter, S. M. Jones, and F. L. W. Ratnieks. (2011). Hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* increase colony defensive perimeter as shown by intra- and inter- specific comparisons. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65:1277–1282.
- Vollet-Neto A., · S. Koffler, · C. F. dos Santos, · C. Menezes, · F. M. F. Nunes, · K. Hartfelder, V. L. Imperatriz-Fonseca, D. A. Alves. Recent advances in reproductive biology of stingless bees. *Insectes Sociaux* (2018) 65:201–212. <https://doi.org/10.1007/s00040-018-0607-x>
- Vollet-Neto A., R. C. Oliveira, S. Schillewaert, D. A. Alves, T. Wenseleers, F. S. Nascimento, V. L. Imperatriz-Fonseca, F. L. W. Ratnieks. Diploid Male Production Results in Queen Death in the Stingless Bee *Scaptotrigona depilis*. *Journal of Chemical Ecology*. April 2017, Volume 43, Issue 4, pp 403–410. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0839-7>.
- von zuben, Lucas Garcia (2012). Determinantes bionômicos e eco-químicos do cleptoparasitismo de *Lestrimelitta limao* Smith. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação de Entomologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.
- Wille, Alvaro. Biology of the stingless bees. *Ann. Rev. Entomol* 1983.28:41-64
- Wilson E. The relation between caste ratios and division of labor in the ant genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae). *Behav Ecol Sociobiol.* 1984; 16(1): 89-98.
- Wilson E.O and Hölldobler, Bert. *The Super-Organism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*, W.W. Norton & Company, 2009, NY.

- Wilson EO. The origin and evolution of polymorphism in ants. Q Rev Biol. 1953; 28(2): 136-56.
- Wilson, E. O. 1971. The Insect Societies. Belknap Press of Harvard Univ. Press. Cambridge, 548p.
- Wilson, E. O. 1980. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera, Formicidae: Atta). In: The overall pattern in *Atta sexdens*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 7: 143-156.
- Wilson, Edward O. The Ergonomics Of Caste In The Social Insects. The American Naturalist. Vol. 102, No. 923
- Wilson, Edward O. and Hölldobler, Bert. PNAS September 20, 2005 102 (38) 13367-13371; <https://doi.org/10.1073/pnas.0505858102>.
- Wittmann D (1985) Aerial defense of the nest by workers of the stingless bee *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). Behav Ecol Sociobiol 16: 111-114.
- Wittmann D, Ratke R, Zeil J, Lübke G, Francke W (1990) Robber bees (*Lestrimelitta limao*) and their host chemical and visual cues in nest defence by *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Apidae: Meliponinae). J Chem Ecol 16: 631-641.
- Yamamura N. Different evolutionary conditions for worker and soldier castes: genetic systems explaining caste distribution among eusocial insects. J Theor Biol. 1993; 161(1): 111-7.
- Yang, A. S., Martin, C. H. & Nijhout, H. F. Geographic variation of caste structure among ant populations. Curr. Biol. 14, 514–519 (2004).
- Yerushalmi S, Bodenheimer S, Bloch G (2006) Developmentally determined attenuation in circadian rhythms links chronobiology to social organization in bees. J Exp Biol 209:1044–1051
- Yew JY, Chung H. Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. Prog Lipid Res (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2015.06.001>
- Zeil, Jochen & Wittmann, Dieter (1989). Visually controlled station-keeping by hovering guard bees of *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Apidae, Meliponinae). Journal of Comparative Physiology A. Volume 165, Issue 5, pp 711-718.
- Zuur A.F., Ieno E.N., Walker N.J., Saveliev A.A., Smith G.M. 2009. Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R. New York, Springer.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N. & Meesters, E.H.W.G. (2009b) A Beginner's Guide to R. Springer, New York.