Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento
de novas colônias de *Tetragera clavipes*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Ivan de Castro

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

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

Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento de novas
colônias de *Tetragona clavipes*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Ivan de Castro

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2012

IVAN DE CASTRO

Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento de novas
colônias de *Tetragona clavipes*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

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

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea
Soares

RIBEIRÃO PRETO – SP

2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Castro, Ivan de

Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento de novas colônias de *Tetragona clavipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Ribeirão Preto, 2012.

99 p. il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Entomologia

Orientador: Soares, Ademilson Espencer Egea

1. *Tetragona clavipes*. 2. Abelhas sem ferrão. 3. Obtenção artificial de rainhas. 4. Minicolônias. 5. Morfometria geométrica de asas. 6. Interação com fungo.

Nome: CASTRO, Ivan de

Título: Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento de novas colônias de *Tetragona clavipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

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

Área de concentração: Entomologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Dedico à minha família,
pelo apoio constante para que essa etapa importante fosse concluída.*

Agradecimentos

À minha família, por apoiar minhas escolhas;

A todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento profissional nesta fase de aprendizado: meu orientador, Ademilson Espencer Egea Soares, pelo apoio, amizade e confiança no meu trabalho desde o início; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que financiou o projeto; ao amigo e técnico do laboratório, Jairo de Souza, pois sem a sua ajuda e empenho na aquisição das colônias este trabalho não seria possível; e aos professores das disciplinas que cursei;

Também aos meus amigos: Bruno Gomes; Vanessa Bonatti, pela orientação com a análise das asas; Mauro Prato e Ana Rita Baptistella, pela convivência e companheirismo ao longo dessa empreitada; Cristiano Menezes e Denise Alves, pelo apoio e troca de informações importantes desde o início da pesquisa;

A todos do laboratório, com os quais convivi, aprendi e criei vínculos de amizade: Geusa, Amanda, Weyder, Ivan Akatsu, Natália, Sávio, Camila, Aline Simoneti, Omar, Christina, Thiago, Raoni, Paulo, Gislaine, Cíntia, Laila, Julia, Claudinéia, Nayara, André, Juliana, Rodrigo, Ana Bomtorin, Aline Aleixo, Fernanda, Lívia, Flávia, Francis, Liliane, David, Michele, Tatiane, Camila Pires, Michelle Manfrini, Rogério, Daiana, Clycie, Joyce e Aline Turcatto.

Aos funcionários do bloco A, do Departamento de Genética da FMRP: Vera, Marcela, Shirlei, Roberto, Pedro; Luis e às secretárias Suzie e Silvia; além das secretárias do Programa de Pós Graduação em Entomologia, do Departamento de Biologia: Renata e Vera, pelo apoio indispensável.

Nenhum cientista pensa com fórmulas.

Albert Einstein
1879 - 1955

O homem nunca inventará algo mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. A necessidade divina, por suas leis, compele o efeito a derivar da causa pelo caminho mais curto.

Leonardo da Vinci
1452 - 1519

Resumo

CASTRO, I. **Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento de novas colônias de *Tetragona clavipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2012. 99 p. Dissertação de Mestrado (Entomologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A criação racional de abelhas sem ferrão, conhecida como meliponicultura, é uma atividade crescente no Brasil e sua demanda abriu o campo para pesquisas que favorecem esse mercado. Além disso, o papel essencial desempenhado por esses insetos na polinização tem chamado atenção para o seu uso sustentável na prática agrícola. Nesses aspectos, alguns trabalhos são direcionados à aquisição de conhecimento básico sobre a biologia dessas abelhas que embasem técnicas de manejo e aprimoramento da sua criação. Um fator crucial é a multiplicação de colmeias em um intervalo de tempo menor a partir da obtenção artificial de rainhas, que é o foco deste trabalho. A espécie aqui envolvida foi *Tetragona clavipes*, que tem distribuição ampla em território brasileiro e um potencial relevante no fornecimento de produtos como mel, pólen, cera e resinas, apesar dos poucos dados sobre seu manejo na literatura afim. Sua diferenciação de castas depende da quantidade de alimento ingerido durante a fase larval. A primeira parte da pesquisa envolveu a criação de larvas *in vitro*, onde foi caracterizada a quantidade limiar para diferenciação de castas: entre 45 e 50 μL . Nessas condições emergiram operárias e rainhas; entre 20 e 40 μL , apenas operárias e a partir de 60 até 110 μL , apenas rainhas. Houve mortalidade alta das larvas, com média de 40%, sendo o controle de umidade relativa o ponto crítico. A segunda parte do trabalho envolveu a tentativa de formar minicolônias, em que grupos com operárias jovens (aproximadamente 50) foram mantidos com rainhas virgens em caixas pequenas. 26 minicolônias foram montadas, dentre estas, 5 com rainhas naturais. Somente duas rainhas naturais foram fecundadas e tiveram sucesso na fundação dos ninhos. Nesses dois casos o número de operárias utilizado foi maior (em torno de 200) e com idades diferentes. O principal fator que limitou essa etapa foi a agressividade das operárias durante a fase para aceitação das rainhas virgens. Nesse ponto, a estratégia mais eficiente foi a introdução de rainhas, ainda em fase de pupa, dentro de cápsulas de cerume da própria minicolônia, apesar de não terem permanecido nas caixas por outros motivos, mesmo estando aceitas. Uma análise complementar durante a pesquisa

mostrou a diferença no padrão de venação entre as asas de operárias e das rainhas obtidas em laboratório, usando morfometria geométrica com os programas de computador tpsDig e MorphoJ. Em todas as colônias observadas, também foi constatada a presença de um fungo que se desenvolve naturalmente no interior das células de cria, cujas hifas são ingeridas pela larva. Entretanto, não foi possível o seu isolamento em meio de cultivo. Apesar do número pequeno de ninhos novos formados, o estudo desta espécie possibilitou a aquisição de dados importantes para a continuidade das pesquisas e também para conduzir seu manejo mais eficiente, acrescentando informações até então desconhecidas sobre sua biologia e seu comportamento.

Palavras chave: *Tetragona clavipes*; abelhas sem ferrão; obtenção artificial de rainhas; minicolônias; morfometria geométrica de asas; interação com fungo.

Abstract

CASTRO, I. **Artificial obtainment of queens and establishment of new colonies of *Tetragona clavipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2012. 99 p. Master's Dissertation (Entomology). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The rational creation of stingless bees, known as meliponiculture in Brazil, is a growing activity and its demand opened the field for research and many works that favor this market. Moreover, the essential role played by these insects as pollinators has drawn attention for its sustainable use in crop pollination. In these respects, some studies are directed to the acquisition of basic knowledge about the biology of these bees which to base management techniques and improvement on its creation. A crucial factor is the multiplication of hives in a shorter interval of time by the artificial obtainment of queens, which is the focus of present work. The species involved here was *Tetragona clavipes*, which has a wide distribution in Brazil and a significant potential to supply products such as honey, pollen, wax and resins, despite the few data about its management in the related literature. Its caste differentiation depends only on the amount of larval food ingested at the larval stage. The first step of the research involved the development of larvae in vitro, when was characterized the amount of larval food that is the threshold for its caste differentiation: between 45 and 50 μL . In these conditions workers and queens emerge; between 20 and 40 μL , only workers and from 60 to 110 μL , only queens. There was a high mortality of larvae with an average of 40%, where the control of relative humidity was the critical point. The second part of the work involved the attempted to form mini colonies, where groups of young workers (around 50) with virgin queens were kept in small boxes. 26 mini colonies were assembled, among these, five with virgins natural queens. Only two natural queens were fertilized and founded nests with success. In these cases the number of workers put inside box was higher (around 200) and with different ages. The main factor that had limited this step was the aggressiveness of the workers during the acceptance of the virgin queens. At this point, the most effective strategy was the introduction of queens still in the pupal stage, inside capsules of cerumen from the own mini colonies, despite not having stayed in the boxes probably by other reasons, even when already were accepted. Additional analysis performed along the study using geometric

morphometrics, with the computer programs tpsDig and MorphoJ, showed a difference in the pattern of wing venation between workers and queens obtained in laboratory. In all colonies observed, also was found the presence of a fungus that grows naturally inside of brood cells, whose hyphae are ingested by the larvae. However, it could not be isolated in culture medium. Despite the small number of new nests acquired, the study of this species allowed the acquisition of important data for further research and also to conduct its management more efficient, adding previously unknown details about its biology and behavior.

Key-words: *Tetragona clavipes*; stingless bees; artificial obtainment of queens; mini colonies; geometric morphometrics of wings; interaction with fungus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Área de ocorrência natural das abelhas sem ferrão destacada em preto	18
Figura 2: Representação gráfica em vista lateral das etapas do ciclo de vida de uma abelha sem ferrão. <i>Desenho</i> : Silvia Cordeiro (VENTURIERI, 2008)	21
Figura 3: Representação gráfica em vista lateral das células em um disco de cria, onde: a) célula real; b) células comuns para o desenvolvimento de machos e operárias; c) célula com larva em fase inicial de alimentação. (<i>Seta indica ovo sobre o alimento larval</i>)	21
Figura 4: Representação gráfica de células de cria em vista lateral, sustentadas por colunas de cerume formando cachos. (<i>Seta indicando célula adjacente</i>)	22
Figura 5: Representação gráfica da estrutura padrão da área de cria dos meliponíneos, mostrando: a) células novas sendo construídas a partir do centro, no topo; b) colunas de cerume entre cada disco de cria; e c) conjunto de discos sobrepostos	24
Figura 6: a) Entrada do ninho de <i>Tetragona clavipes</i> , construído em cavidade no tronco de uma árvore; b) Vista superior da área de cria em ninho estabelecido em caixa de criação racional (a camada superior do invólucro está removida)	35
Figura 7: Potes com alimento armazenado: a) mel e b) pólen, dentro de melgueiras	35
Figura 8: Operárias de <i>Tetragona clavipes</i> manipulando resina no interior da colmeia	36
Figura 9: a) Agregação de machos em um ninho órfão; b) Macho pousado próximo à colmeia; c) Operária construindo célula de cria, no interior do ninho	36
Figura 10: Hifas de fungo nas bordas internas das células de cria de <i>Tetragona clavipes</i>	37
Figura 11: a) Colmeia com ninho de <i>Tetragona clavipes</i> ; b) Entrada do ninho	41
Figura 12: a) Micropipetador usado durante a medição do volume de alimento larval contido nas células de cria; b) Capilar graduado com alimento coletado; c) Células de cria desoperculadas, contendo alimento larval e ovos; d) Coleta do alimento larval; e) Alimento armazenado em microtubo de 1,5 mL	42
Figura 13: Esterilizador Suya modelo UV Export, com lâmpada germicida de luz ultravioleta	43
Figura 14: a) Pipeta automática usada para distribuição do alimento nas placas de acrílico; b) Vista lateral do alimento distribuído; c) Placa contendo alimento e dentro de recipiente com umidade relativa controlada	43
Figura 15: a) Representação do modo de coleta do ovo; b) Vista superior de um ovo transferido; c) Vista lateral de um ovo transferido	44
Figura 16: Rainha de <i>Tetragona clavipes</i> recém emergida, obtida artificialmente	45
Figura 17: Vista superior da minicolônia, com tampa de vidro levantada	46
Figura 18: a) e b) Rainha marcada junto com operárias jovens; c) Caixas contendo um grupo de operárias jovens e uma rainha em cada	47
Figura 19: Conjunto de caixas ligadas em paralelo a sistema elétrico com termostato	47

Figura 20: Foto da asa anterior de rainha de <i>Tetragona clavipes</i> obtida em laboratório, sob aumento de 20x em lupa. Os pontos assinalados foram utilizados como referência para a análise de morfometria geométrica	49
Figura 21: a) Colônia de <i>Tetragona clavipes</i> estabelecida em caixa para criação racional, durante manutenção do ninho; b) Pupas de forídeos no fundo de outro ninho, que foi infestado pelas moscas	52
Figura 22: Comparação entre o volume de alimento larval encontrado nas células de cria: a) vista superior; b) conteúdo das respectivas células transferido para microtubos de 0,5 mL	54
Figura 23: Larvas comendo alimento em excesso, antes de morrerem	56
Figura 24: Estágios do desenvolvimento de <i>Tetragona clavipes</i> durante criação artificial de suas larvas	59
Figura 25: Larvas de <i>Tetragona clavipes</i> mortas, após ingerirem alimento de <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	61
Figura 26: a) Vista superior; b) Sistema de aquecimento montado e tubo para acesso das abelhas atravessando a parede; c) Extremidade do tubo fora da sala de observação.....	61
Figura 27: a) Rainha natural fecundada em fase inicial de postura; b) e c) Primeiras células de cria com ovos; d) Seta indicando o ovo	62
Figura 28: a) Vista superior da minicolônia, com parte do invólucro removido mostrando as células de cria e potes de alimento; b) Células de cria novas.....	62
Figura 29: a) Uma das caixas de isopor onde as minicolônias foram introduzidas e mantidas com temperatura mínima controlada por termostato, em 28 °C; b) Caixa com minicolônia no interior da caixa de isopor, tampada com folha de acetato transparente; c) Primeiras células de cria com ovos; d) Células de cria após uma semana da fecundação da rainha.....	63
Figura 30: a) Hifas de fungo crescendo sobre a superfície do alimento larval após 12 dias da transferência de larvas; b) Seta indicando a larva morta; c) O mesmo poço no 15º dia; e d) 16º dia	64
Figura 31: Resíduos de Procrustes dos 10 marcos anatômicos projetados no contorno da asa de uma operária de <i>T. clavipes</i> . Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e os azuis a média dos resíduos.....	65
Figura 32: Desenho do contorno da asa de uma rainha deformado pela sobreposição com o centroide das operárias. Seta indica ramificação de veia observada nas asas das rainhas.....	67
Figura 33: Microfotografias das asas de <i>T. clavipes</i> . Em a) Operária natural; b) Operária obtida em laboratório com 30 µL de alimento larval; c) 40 µL (seta indica um vestígio do início de formação da veia); d) 50 µL; e) 60 µL; f) 80 µL, g) 90 µL; h) 100 µL. A partir de d são rainhas.....	68

Figura 34: Comparação entre pupas de <i>T. clavipes</i> em estágio de pigmentação, onde a) Rainha natural obtida de uma célula real, b) Operária obtida em laboratório usando 40 µL de alimento larval; c) macho gigante encontrado em célula real. A seta indica uma das corbículas da operária.....	69
Figura 35: a) Forídeo adulto; b) Ovos de forídeos botados dentro do pote de pólen de uma colônia de <i>T. clavipes</i> transferida.....	71
Figura 36: a) Disco de cria cortado durante coleta de células; b) Células de cria expostas com alimento larval escorrido.....	72
Figura 37: Larvas que morreram em estágios de desenvolvimento distintos. Em I), II) e III) enquanto se alimentavam; IV) após ter ingerido todo o alimento; V) e VI) após defecarem.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Amostragem do volume de alimento larval encontrado em células de cria de <i>Tetragona clavipes</i> . (n=50).....	53
Gráfico 2: Comparação entre o volume de alimento larval encontrado em células de cria de <i>Tetragona clavipes</i> . (Operárias e machos, n= 200; Células reais, n= 10).....	53
Gráfico 3: Diferença de pH do alimento larval de <i>Tetragona clavipes</i> (n= 70).....	55
Gráfico 4: Variação individual do peso das rainhas obtidas com 100 µL de alimento larval.....	56
Gráfico 5: Variação do peso médio das rainhas obtidas com volumes diferentes de alimento larval. (n=14).....	57
Gráfico 6: Duração de cada estágio do desenvolvimento das larvas de <i>Tetragona clavipes</i> , para volumes diferentes de alimentação. (n=15).....	58
Gráfico 7: Variação do peso de abelhas recém emergidas usando volumes diferentes de alimento. (n=15). (* <i>Peso de operárias naturais</i>).....	60
Gráfico 8: Porcentagem da variação encontrada nas 16 medidas de deformações relativas dos componentes principais.....	66
Gráfico 9: Dispersão dos valores dos componentes principais que apresentaram maior variação em cada indivíduo amostrado, PC1= 65,67% e PC2= 11,52).....	66
Gráfico 10: Transformação em rede do gráfico que mostra a variação na forma do componente principal 1, entre os marcos anatômicos de uma rainha e os do ponto consenso. Os traços em azul escuro são as distâncias relativas de cada marco.....	67
Gráfico 11: Variação entre o pH do alimento larval em células de cria recém operculadas de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> e <i>Tetragona clavipes</i> . (n= 20).....	76
Tabela 1: Taxa de natalidade na obtenção artificial de rainhas usando volumes diferentes de alimento larval (n=20).....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	HISTÓRIA DAS ABELHAS.....	17
1.2	CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS MELIPONÍNEOS.....	18
1.3	VIDA SOCIAL.....	19
1.4	DETERMINAÇÃO DE CASTAS.....	20
1.5	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MELIPONÍNEOS.....	24
1.6	IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E ECONÔMICA DAS ABELHAS.....	26
1.6.1	Polinização.....	26
1.6.2	Meliponicultura.....	30
1.7	PRODUÇÃO ARTIFICIAL DE RAINHAS.....	32
1.8	A ESPÉCIE EM FOCO.....	34
1.8.1	Características gerais de <i>Tetragona clavipes</i>	34
1.8.2	Ocorrência natural de fungos nas células de cria de <i>T. clavipes</i>	37
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Objetivo geral.....	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	Aquisição de colônias de <i>Tetragona clavipes</i>	41
3.2	Coleta e aferição do volume de alimento larval das células de cria.....	42
3.3	Distribuição do alimento larval nas células artificiais e criação das larvas.....	43
3.4	Montagem e análise do desenvolvimento de minicolônias.....	46
3.5	Análise de asas com uso de morfometria geométrica.....	49
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Estabelecimento dos ninhos de <i>T. clavipes</i> que foram transferidos.....	52
4.2	Volume de alimento larval encontrado nas células de cria.....	52
4.3	Criação de larvas e obtenção de rainhas em laboratório.....	54
4.4	Montagem das minicolônias.....	61
4.5	Tentativa de cultivo do fungo em laboratório.....	64
4.6	Diferenças no padrão da venação em asas das castas de <i>Tetragona clavipes</i>	65
4.7	Ocorrência de machos gigantes em <i>Tetragona clavipes</i>	69
5	DISCUSSÃO.....	71
5.1	Suscetibilidade de <i>Tetragona clavipes</i> à infestação por forídeos.....	71
5.2	Criação das larvas de <i>Tetragona clavipes</i> em laboratório.....	73
5.3	Montagem das minicolônias.....	77
5.4	Morfometria geométrica de asas aplicada em <i>Tetragona clavipes</i>	79
5.5	Presença de fungos no alimento larval.....	83
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
8	ANEXOS.....	97
8.1	Lista de espécies de plantas usadas por <i>Tetragona clavipes</i> para forrageamento.....	97
8.2	Lista de espécies de plantas utilizadas por <i>Tetragona clavipes</i> para nidificação.....	99

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DAS ABELHAS

As abelhas são organismos invertebrados pertencentes ao filo dos artrópodes, à classe dos insetos (Hexapoda) e à ordem Hymenoptera, a qual inclui também vespas e formigas.

A hipótese aceita atualmente que explica o aparecimento das abelhas é que esses insetos derivaram de um grupo de vespas esfeciformes que, a partir do surgimento das plantas com flores, abandonaram o hábito caçador de presas e passaram a coletar recursos vegetais (pólen e néctar), provendo dessa fonte de alimento às suas larvas (MICHENER, 2007).

Com base em datações fósseis, é possível inferir que o aparecimento das angiospermas ocorreu durante o período Cretáceo e a diversificação dos grupos de abelhas teria acompanhado a primeira grande radiação dessas plantas floríferas, ocorrida entre 130 e 90 milhões de anos atrás (SILVEIRA e cols., 2002). Desde então, surgiu uma relação estreita e benéfica a ambas que foi moldada ao longo do tempo.

Visualmente, as diferenças marcantes entre abelhas e vespas são que as primeiras possuem um corpo mais robusto e piloso e apresentam pelos plumosos, sendo que nas vespas os pelos são simples (MICHENER, 2007).

A abelha fossilizada reconhecida como sendo a mais antiga é da espécie *Cretotrigona prisca*, com características típicas de um meliponíneo e datação estimada em 65 milhões de anos (ENGEL, 2000). Como os meliponíneos representam um dos grupos de abelhas mais derivados, isso nos sugere que, na época em que essa espécie viveu, uma grande parte dos grupos de abelhas com a diversidade morfológica e comportamental, observadas nas linhagens atuais, já havia surgido ao final do período Cretáceo (SILVEIRA e cols., 2002).

Atualmente, estima-se que existam cerca de vinte mil espécies de abelhas espalhadas pelas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre, dentre as quais, três mil estão em território brasileiro. De um total estimado em mil espécies para o estado de São Paulo, 729 são conhecidas e estão distribuídas em 145 gêneros (PEDRO e CAMARGO, 1999).

1.2 CLASSIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS MELIPONÍNEOS

Os trabalhos de classificação e nomenclatura têm sofrido revisões, modificações e propostas recentes. Segundo MICHENER (2007), as abelhas sem ferrão estão agrupadas na seguinte classificação hierárquica: subordem Apocrita, superfamília Apoidea, família Apidae e subfamília Apinae, a qual abriga dezenove tribos, dentre elas a Meliponini, formada pelo grupo dos meliponíneos.

Em alguns trabalhos encontramos outra descrição, segundo SILVEIRA e cols. (2002), que classificam a subfamília Apinae em dezessete tribos, uma delas a Apini, que inclui as subtribos Apina, Bombina, Euglossina e Meliponina, sendo esta última formada pelos meliponíneos. Nesta proposta, alguns clados classificados como gênero por SILVEIRA são tratados como subgêneros de *Trigona* por MICHENER.

Ambos autores reconhecem os mesmos grupos e a divergência nestas classificações dizem respeito à sua posição nos clados. Para este trabalho a classificação adotada e seguida no texto foi a de MICHENER.

A distribuição das espécies concentra-se em áreas tropicais e subtropicais em todos os continentes (figura 1), porém, em certos lugares como na África, Ásia e Austrália, a diversidade de meliponíneos é muito menor quando comparada à que encontramos na América do Sul e a sua história de ocupação natural e distribuição biogeográfica permanecem em debate (SILVEIRA e cols., 2002; MICHENER, 2007).

Figura 1. Área de ocorrência natural das abelhas sem ferrão destacada em preto.

1.3 VIDA SOCIAL

Cerca de 80% das espécies de abelhas tem comportamento solitário e uma minoria, 5%, tem comportamento social, formando ninhos populosos que podem chegar a milhares de indivíduos; o restante são espécies que parasitam ninhos de outras abelhas (MICHENER, 2007).

Nos grupos considerados altamente sociais, ou eussociais, como nas tribos Apini e Meliponini, existe a divisão em castas, uma categoria exclusiva das fêmeas onde observamos diferenças morfológicas, comportamentais e funcionais entre operárias e rainhas. Além disso, há sobreposição de gerações e o cuidado com a cria.

Às rainhas cabe a função reprodutiva e assegurar a união da colônia, enquanto os trabalhos de construção, manutenção, proteção do ninho e busca por alimento são realizados pelas operárias.

Nas operárias observamos o polietismo etário, caracterizado pela divisão de trabalho em função da idade de cada indivíduo, ou seja, ao longo da vida, uma operária exerce tarefas distintas começando com atividades internas, como construção de células de cria e limpeza do linho e, quando mais velhas, saem da colônia para buscar alimento.

Na ordem Hymenoptera, as fêmeas desenvolvem-se a partir de óvulos fecundados, enquanto os machos resultam do desenvolvimento de óvulos não fecundados em um processo conhecido como partenogênese arrenótoca, sendo então indivíduos haploides e portadores da metade do número de cromossomos da espécie.

As operárias são consideradas inférteis e possuem ovários reduzidos, no entanto, especificamente nos meliponíneos, é bastante comum que elas botem ovos tróficos, que são consumidos pela rainha no momento em que ela inspeciona a célula antes da postura do seu próprio ovo.

Alguns trabalhos já mostraram que, em muitas espécies, operárias podem apresentar ovários ativos e botam ovos funcionais, cujo desenvolvimento origina indivíduos machos. Esse fenômeno é muito discutido dentro da ecologia comportamental por tratar o conflito de interesses reprodutivos existente na colônia, uma vez que os machos são haploides e, dessa forma, são geneticamente mais próximos às suas progenitoras ($r = 0,50$). Assim, as operárias têm uma vantagem

com o aumento do seu desempenho reprodutivo se também tiverem filhos (PETERS e cols. 1999; TÓTH e cols., 2002; LACERDA e SIMÕES, 2006; ALVES e cols., 2008).

1.4 DETERMINAÇÃO DE CASTAS

Nas tribos Apini e Meliponini, o surgimento de rainhas é condicionado pelo fator trofogenico, ou seja, em função da alimentação fornecida às larvas (exceto no gênero *Melipona*, discutido adiante). Desse modo, todas as larvas fêmeas têm a capacidade natural para se tornarem rainhas, desde que recebam a alimentação adequada, sendo assim consideradas totipotentes.

Entretanto, na tribo Apini, representada pelo único gênero *Apis*, existem as operárias nutrizes que fornecem progressivamente o alimento à cria diretamente em cada alvéolo, onde a larva cresce. Neste caso, o que influencia a diferenciação das larvas é a qualidade do alimento. A rainha de *Apis*, durante toda sua vida desde a fase larval, é alimentada com geleia real (uma secreção produzida pelas glândulas hipofaringeanas das operárias nutrizes) enquanto que as larvas que originam operárias recebem uma alimentação a base de mel e pólen após o terceiro dia de vida (CARANTÓN e cols., 2010).

Recentemente, o mecanismo envolvido no processo de determinação de castas em Apini começou a ser elucidado, revelando a participação de uma proteína em uma via metabólica que induz o crescimento dos ovários e acelera o desenvolvimento da larva, denominada *royalactin* (KAMAKURA, 2011). Essa proteína está presente na geleia real e, à medida que é fornecida às larvas na quantidade ideal, induz a diferenciação das castas.

O processo ocorre de modo peculiar nos meliponíneos. Primeiramente porque, na tribo Meliponini, a alimentação é do tipo massal, em que as operárias constroem as células de cria e aprovisionam uma quantidade de alimento larval uma única vez para que a rainha bote o ovo, que fica em posição vertical aderido à superfície do alimento (figura 2). Depois disso a célula é operculada e a larva nunca tem contato direto com qualquer operária durante o seu desenvolvimento.

Figura 2. Representação gráfica em vista lateral das etapas do ciclo de vida de uma abelha sem ferrão.
Desenho: Silvia Cordeiro (VENTURIERI, 2008).

processo constante e cíclico.

O alimento fornecido para toda a cria da colônia é o mesmo e, para a maioria dos gêneros, o fator desencadeante da diferenciação de castas é apenas a quantidade de alimento ingerido durante a fase larval.

Assim, para que nasça uma rainha nessas condições, as operárias constroem células maiores conhecidas como células reais ou realeiras (figura 3a), nas quais aprovisionam um volume maior de alimento e a larva fêmea que des

Ocasionalmente, uma larva macho pode desenvolver-se dentro de uma célula real originando assim um macho gigante, condição relatada para várias espécies de meliponíneos (ALVES e cols., 2009). Apenas o uso de técnicas de avaliação molecular pode revelar, neste caso, se o macho provém do ovo de uma rainha ou de uma operária. Existe a possibilidade de as duas terem botado na mesma célula de cria e a larva macho, filho de operária, comer a outra larva. No entanto, esse fenômeno de larvofagia parece não ser um padrão observado dentro de meliponíneos (LACERDA e SIMÕES, 2006).

Dentro da célula de cria e após a eclosão do ovo, a larva continua sobre o alimento e o ingere progressivamente sem defecar, até a fase pré-pupa, quando tece um casulo de seda e defeca pela primeira vez. Após a metamorfose, os adultos emergem depois de alguns dias e o conjunto de células, que serviram de abrigo para o desenvolvimento da cria, é completamente destruído por outras operárias, sendo necessário que células novas sejam construídas em um

Figura 3. Representação gráfica em vista lateral das células em um disco de cria, onde: a) célula real; b) células comuns para o desenvolvimento de machos e operárias; c) célula com larva em fase inicial de alimentação. (*Seta indica ovo sobre o alimento larval*).

Nos gêneros *Frieseomelitta* e *Leurotrigona*, cujas operárias constroem a área de cria sem invólucro de cerume e com as células dispostas em forma de cacho (figura 4), existe uma peculiaridade: as operárias constroem uma célula adjacente, contendo apenas alimento larval, de forma contígua à outra célula, cuja larva ainda

Figura 4. Representação gráfica de células de cria em vista lateral, sustentadas por colunas de cerume formando cachos. (Seta indicando célula adjacente).

está se alimentando e, em determinado momento, a larva rompe a parede que as separa e ingere uma quantidade extra de alimento. Concomitante a isso, as operárias remodelam as duas células transformando-as num casulo real, onde se desenvolve a larva da futura rainha.

No gênero *Melipona* ocorre um terceiro modo para o surgimento das rainhas que é influenciado por fatores genéticos, ainda não esclarecidos completamente. Neste caso, não existe uma célula diferenciada como a realeira ou o casulo real, ou seja, todas as células de cria possuem o tamanho e a capacidade de armazenamento semelhantes, porém, diferenças na quantidade de alimento depositado em cada célula modulam o mecanismo da diferenciação de castas, podendo influenciar a síntese do hormônio juvenil.

Em um estudo envolvendo a comparação de traços morfológicos externos entre operárias, rainhas e machos de duas espécies de *Melipona* (*M. marginata* e *M. compressipes*), foi verificado que as operárias são mais parecidas com os machos do que com as rainhas da mesma colônia. Isso seria possível devido à ação de genes masculinizantes que atuam na formação das características anatômicas das operárias, fazendo com que se pareçam mais com os machos do que com rainhas da própria espécie (BONETTI e KERR, 1984). No mesmo estudo, machos que foram tratados com hormônio juvenil durante a fase larval apresentaram, quando adultos, caracteres próximos aos de rainha, confirmando assim a ação do hormônio sobre a expressão dos genes feminilizantes que, nesta condição, foram ativados.

Neste caso, as operárias não teriam a expressão dos genes feminilizantes durante a metamorfose, momento no qual os discos imaginais se diferenciam e desenvolvem os apêndices, apresentando caracteres masculinizados quando adultas.

Sabe-se que cerca de 25% das larvas fêmeas possuem a capacidade genética para se desenvolverem em rainhas (KERR e cols., 1996; KERR, 1997), entretanto, dados obtidos de *Melipona scutellaris* mostraram uma variação no volume total de alimento larval armazenado, bem como na concentração de proteínas da camada superior do alimento e do pólen em cada célula de cria analisada, corroborando a ideia de que o fator alimentar pode influenciar a variação nas taxas de surgimento de rainhas em circunstâncias ambientais distintas (MENEZES e cols., 2007).

Rainhas novas emergem constantemente em uma colônia e muitas delas podem ser sacrificadas pelas operárias, expulsas ou aprisionadas em câmaras especiais, chamadas células de aprisionamento, até que estejam aptas para ocupar o lugar da rainha mãe quando esta morre ou fundarem ninhos próprios através de uma enxameação, se a época for propícia para isso.

Cada colônia possui uma única rainha fisogástrica, ou seja, que já foi fecundada e atua na postura de ovos. Entretanto, temporariamente pode ocorrer a poliginia, em que mais de uma rainha participa dessa condição dominante, geralmente no período de substituição natural da rainha. Em um relato de caso, cinco rainhas poedeiras foram encontradas em uma colônia de *Melipona scutellaris*, caracterizando uma situação anormal e que carece de estudos aprofundados (CARVALHO e cols, 2011).

O processo natural de reprodução acontece quando uma rainha virgem sai da colônia com algumas operárias e fundam um ninho novo em outro local, preparado anteriormente por operárias que, por algum tempo, levam recursos do ninho antigo, como mel e própolis. Posteriormente, a rainha sai do ninho e realiza um voo nupcial próximo ao local de nidificação, momento em que atrai vários machos que formam uma agregação (CORTOPASSI-LAURINO, 2007). Após o acasalamento os machos dispersam e a rainha segue para o ninho novo, iniciando o trabalho de postura dentro de alguns dias.

Geralmente o ninho novo é fundado em um local próximo à colônia mãe, pois permanece dependente dela por semanas ou até meses, até que esteja populoso e com um número suficiente de operárias capazes de autossustentar a colônia nova em suas necessidades básicas. Até que chegue esse momento, as operárias continuam em contato com o ninho antigo buscando recursos, principalmente alimento (NOGUEIRA-NETO, 1997).

1.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MELIPONÍNEOS

A maioria das espécies de meliponíneos constrói os ninhos em cavidades preexistentes podendo ocupar vários tipos de substrato, principalmente ocos em tronco de árvores. No ambiente urbano, encontramos frequentemente ninhos dentro de paredes de alvenaria e muros de pedras. Certas espécies constroem ninhos expostos, protegidos por camadas de barro e resinas como *Trigona spinipes* e *Trigona hyalinata*, além das que nidificam no subsolo, como *Trigona recursa* (NOGUEIRA-NETO, 1997; FREITAS e SOARES, 2004; FREITAS e cols., 2009; MATEUS, 2009).

A estrutura do ninho de uma abelha sem ferrão é variável e depende da espécie, mas podemos dizer que segue um padrão, com a área de cria separada dos potes de alimento.

As células de cria, ou alvéolos, podem ser construídas isoladamente e distanciadas por colunas de cerume, como já mencionado para os gêneros *Frieseomelitta* e *Leurotrigona* (figura 4) ou, como na maioria das espécies, são agrupadas lateralmente formando placas, os chamados discos de cria (figura 5).

Figura 5. Representação gráfica da estrutura padrão da área de cria dos meliponíneos, mostrando: a) células novas sendo construídas a partir do centro, no topo; b) colunas de cerume entre cada disco de cria; e c) conjunto de discos sobrepostos.

Esses discos são dispostos horizontalmente uns sobre os outros e sustentados por pequenas colunas de cerume, de forma que o espaço entre cada disco permite a passagem das abelhas. Cada célula nova é construída aderida à lateral da parede das outras, a partir do centro dos discos, formando discos novos no sentido ascendente. Geralmente, o conjunto dos discos é envolvido por lamelas, também de cerume, que formam um invólucro que atua como proteção e controle da temperatura da área de cria, assegurando o desenvolvimento apropriado das larvas e pupas.

Os potes de alimento comumente têm formato oval, também são construídos com cerume e guardam separadamente o estoque de mel e pólen coletados, muitas vezes formando aglomerados empilhados que são reestruturados conforme a utilização e disponibilidade dos recursos (KERR e cols., 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Externamente, a entrada dos ninhos é variada e pode ser utilizada como característica de identificação das espécies, que podem ornamentá-lo agregando diversos materiais como barro, sementes e até fezes junto à cera e resinas vegetais. A maioria dos trigoniformes constrói um tubo de cerume na entrada da colônia onde, na sua extremidade, encontramos várias abelhas guarda a postos e prontas para a defesa do ninho, cuja estratégia também varia.

As operárias de *Oxytrigona tataira tataira*, uma das espécies mais agressivas, por exemplo, secretam um composto ácido em suas glândulas mandibulares e o liberam no momento em que pousam e mordem o agressor, comumente nas regiões do corpo que tenham pelos. No entanto, outras espécies apenas mordem ou depositam resina como forma de repressão a um possível invasor do ninho e em alguns casos de abelhas menores, como Iraí (*Nannotrigona testaceicornis*) e Mirim (*Plebeia droryana*), as operárias não demonstram agressividade quando perturbadas.

As estratégias de defesa são eficientes contra certos inimigos naturais como formigas, aranhas e outras abelhas, como as da espécie *Lestrimelitta limao*. Conhecida como Abelha Limão ou Iratim, esta abelha possui um comportamento cleptoparasita, ou seja, as operárias invadem a colônia de outra espécie e roubam grande parte do alimento armazenado, chegando a destruir um ninho que esteja fragilizado e com poucas operárias (NOGUEIRA-NETO, 1997). Os meliponíneos mais vulneráveis são os de porte pequeno, como *Tetragonisca angustula*, *Nannotrigona testaceicornis* e *Plebeia droryana*.

Um estudo publicado recentemente mostrou que cerca de 1% das operárias de *Tetragonisca angustula*, conhecida popularmente como Jataí, apresenta tamanho do corpo relativamente maior que em outras operárias da mesma colônia e comportam-se de forma diferente, dedicando a maior parte do seu tempo de vida aos trabalhos de defesa do ninho, atuando como soldados. Esse seria o primeiro caso relatado de uma casta especializada nesta função no grupo das abelhas que, provavelmente, seja resultado de uma pressão seletiva proporcionada pela presença das abelhas invasoras (GRÜTER e MENEZES, 2012).

1.6 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E ECONÔMICA DAS ABELHAS

1.6.1 Polinização

Os vegetais compõem a base produtiva da cadeia alimentar e a energia transformada por eles é repassada na forma de alimento e matéria prima para a maioria dos seres, estejam em ambientes aquáticos ou terrestres. Entretanto, o processo descrito a seguir é um exemplo em que as plantas se beneficiam de outros seres vivos, neste caso, para se reproduzirem.

Durante o processo evolutivo, o surgimento dos grãos de pólen foi um passo importante para a adaptação efetiva das plantas ao ambiente terrestre, pois passaram a não depender do meio excessivamente úmido para dispersar seus gametas (RAVEN e cols., 2007; KARASAWA, 2009).

Antes da atuação de animais no processo de polinização, o serviço foi proporcionado primeiramente pelo vento, caracterizando assim a polinização anemófila. O primeiro grupo de plantas que se beneficiou com esse mecanismo foi o das gimnospermas, cujos representantes mais comuns são os pinheiros, sequoias e ciprestes.

Há cerca de 130 milhões de anos, com o surgimento das angiospermas, houve um estreitamento na relação entre as plantas e os insetos, os quais passaram a obter uma fonte nutricional para sua dieta através do néctar e do pólen oferecido pelas flores. Além disso, as plantas passaram a oferecer outros atrativos como

substâncias voláteis ou óleos, secretados por estruturas especializadas nas flores. Essa interação gerou adaptações tão intensas que, atualmente, várias espécies de plantas dependem exclusivamente de determinados grupos ou até mesmo de uma única espécie de polinizador para se reproduzir.

As adaptações evolutivas incluem transformações em estruturas da flor que levam à formação de traços conhecidos como síndromes florais, um conjunto de características que induzem interações específicas entre a planta e seu agente polinizador. Um exemplo comum é o formato do bico dos beija flores, adaptados à coleta de néctar em flores com corola tubular.

O mecanismo de polinização ocorre através do transporte dos grãos de pólen que são produzidos na antera do androceu (órgão masculino da flor) até o estigma, do gineceu (órgão feminino) localizado na flor de outra planta da mesma espécie, o que caracteriza uma polinização cruzada. Se o estigma estiver receptivo, ou seja, pronto e amadurecido para sua função, os grãos de pólen germinam e forma-se um tubo polínico, que cresce através do estilete e conduz a célula germinativa até a oosfera. Depois da fecundação forma-se o zigoto, que mais tarde torna-se o embrião da semente (RAVEN e cols., 2007).

A polinização cruzada entre as plantas é um fator importante que garante a diversidade e sustentação de ecossistemas e, no decorrer do processo evolutivo, outros organismos passaram a participar desse processo, como algumas espécies de aves e morcegos, mas os principais continuam a ser os insetos, majoritariamente as abelhas.

As fêmeas das tribos Apini, Bombini, Euglossini e Meliponini, possuem corbículas localizadas na tíbia posterior (no terceiro par de pernas), caracterizadas pela expansão achatada do tegumento, que forma uma superfície côncava e margeada por cerdas (MICHENER, 2007). São estruturas adaptadas ao ciclo de vida desses insetos que permitem o transporte de materiais como barro, óleo, resinas e pólen, sendo uma característica marcante que diferencia esses grupos de outras abelhas e também das vespas.

Acontecem algumas exceções como, por exemplo, nas tribos Apini e Meliponini, onde existem castas especializadas e tanto as rainhas como os machos não possuem corbículas desenvolvidas. Na tribo Euglossini, os machos possuem corbículas que utilizam para coleta de substâncias odoríferas nas flores de certas orquídeas, sendo um grupo importante de agentes polinizadores para essa família de plantas.

O comportamento especializado para coleta de recursos florais, aliado à presença da grande quantidade de pelos e cerdas espalhados por todo o corpo do inseto que, ocasionalmente, auxiliam no transporte acidental dos grãos de pólen, é o fator que torna as abelhas agentes polinizadores excelentes.

Nos biomas brasileiros, estima-se que as abelhas sejam responsáveis por cerca de 40% a 90% da polinização e, conseqüentemente, pelo sucesso reprodutivo das plantas floríferas (KERR, 1996).

Segundo VAMOSI e cols., 2006, atualmente os ecossistemas que abrigam uma variedade maior de espécies de plantas sofrem não só pela destruição constante do hábitat, mas também pela limitação da polinização, uma vez que a competição por esse serviço é grande e tende a aumentar devido à queda atual do número de agentes polinizadores, com destaque para as abelhas.

Nesse contexto, a criação racional de abelhas nativas também favorece a manutenção das populações silvestres de espécies, que participam efetivamente na sustentação de ecossistemas muito dependentes da ação polinizadora e, assim, contribui para reverter esse processo (IMPERATRIZ-FONSECA, 2007).

Esse potencial começou a ser direcionado para projetos que utilizam a polinização em lavouras de todo o mundo. Começou-se com as variedades europeias da espécie *Apis mellifera*, cujas colônias apresentam um grande número de indivíduos e são historicamente criadas em colmeias para o aproveitamento dos produtos apícolas, principalmente o mel.

Atualmente, existe um comércio importante entre agricultores e apicultores cujos serviços de polinização garantem a maior produção de frutos e sementes para o setor agrícola, conseqüentemente incrementando a obtenção de produtos apícolas. Em escala global, estima-se que o valor movimentado nesse tipo de comércio gire em torno de \$ 200 bilhões por ano (SLAA e cols., 2006).

Alguns exemplos de espécies de abelhas já usadas comercialmente para polinização de culturas são: *Osmia cornifrons*, para polinização de árvores frutíferas no Japão, principalmente macieiras; *Megachile rotundata*, polinizadora eficiente de alfafa e cenoura nos Estados Unidos e outros países; e *Bombus terrestris*, polinizadora de tomates cultivados em estufas europeias (MICHENER, 2007).

Este é um campo promissor para o uso das abelhas nativas, como é o caso dos meliponíneos no Brasil, pela sua diversidade de espécies e por estarem adaptadas ao ambiente, o que facilita o seu manejo (MAUÉS, 2002 ; IMPERATRIZ-FONSECA, 2007).

Em apicultura, que é o manejo de *Apis*, são necessários cuidados preventivos de acidentes com uso de roupas e equipamentos especiais, pois elas ferem e são defensivas naturalmente. Enquanto que na criação racional e manejo dos meliponíneos, que apresentam o acúleo (ferrão) atrofiado, é necessária apenas uma máscara de proteção para o rosto, pois podem morder e dificultar o manejo, dependendo da espécie.

No Brasil, em um experimento relacionado à cultura do morango no estado de São Paulo, foram coletados vários espécimes fazendo o forrageamento nas flores do morangueiro, em que os meliponíneos representaram 63% dos visitantes florais em uma cultura no município de Atibaia e 25% em outra cultura, no município de Valinhos (MALAGODI-BRAGA, 2002). Quando as análises foram direcionadas para a atuação dos insetos no interior de estufas, os frutos formaram-se com uma qualidade melhor e sem deformações, confirmando o sucesso nesse tipo de estratégia. Dentre as espécies que se destacaram no experimento estão *Trigona spinipes* e *Tetragonisca angustula*.

A melhoria na condição morfológica dos frutos está relacionada intimamente com o processo de polinização, uma vez que a atuação dos agentes polinizadores aumenta as chances de fecundação para muitos óvulos na flor ou inflorescência, acarretando o crescimento de frutos com mais sementes, consequentemente maiores e mais saborosos.

Dessa forma, a utilização das abelhas como agentes polinizadores direcionados a diversos tipos de culturas traz benefícios importantes, não apenas em relação à condição melhor dos frutos, mas em relação à produtividade, se considerarmos o fornecimento de legumes e hortaliças. Para a produção de sementes de cebola, por exemplo, houve um acréscimo superior a 20% na produtividade em relação às parcelas sem a presença de insetos visitantes das flores (WITTER e BLOCHTEIN, 2003).

1.6.2 Meliponicultura

Registros maias revelam que nas civilizações pré-colombianas, na América Central, já era praticada a criação racional de abelhas sem ferrão com um conhecimento vasto sobre as espécies e o modo de vida desses insetos, muito valorizados e reverenciados por essas populações nativas. No Brasil, os produtos dessas abelhas, provavelmente, sempre constituiu recurso alimentar extraído predatoriamente pelos índios, que consomem os estoques de mel e pólen da colônia e suas larvas (NOGUEIRA-NETO, 1997, CORTOPASSI-LAURINO e cols., 2006).

O termo meliponicultura foi criado pelo pesquisador brasileiro e criador de abelhas sem ferrão, Dr. Paulo Nogueira-Neto, e refere-se à atividade de criação racional dessas abelhas eussociais nativas, representando atualmente, desde uma atividade meramente de lazer e distração a uma fonte de renda extra para pequenos produtores, oferecendo ainda um enriquecimento da dieta alimentar humana.

A maioria dos produtos obtidos das abelhas é proveniente da coleta que as operárias realizam em campo e estocam no interior dos ninhos. O mel é o resultado do processamento do néctar das flores e fonte de carboidratos, sais minerais e certas vitaminas, enquanto o pólen fornece lipídeos e proteínas para a alimentação, principalmente das suas larvas.

Poucas abelhas consomem proteínas oriundas de fonte animal, como é o caso de *Trigona hypogea*, *T. crassipes* e *T. necrophaga*, cujas operárias coletam carne em decomposição, que caracteriza uma reversão do comportamento do grupo (GILLIAM e cols., 1985; SERRÃO e cols., 1997; MICHENER, 2007).

Outro material de extrema importância para a manutenção da colônia é a própolis, uma mistura de resinas vegetais armazenada pelas abelhas e usada para vedar as frestas no interior do ninho e também misturada com barro e/ou cera (geoprópolis e cerume, respectivamente), formando estruturas para sustentação e proteção do ninho (NOGUEIRA-NETO, 1997).

A própolis de *Apis* é usada efetivamente com finalidade medicinal, pois seus componentes apresentam ação cicatrizante, anti-inflamatória e inibição do crescimento de microrganismos patógenos. Estudos recentes demonstraram que seus componentes estimulam a atividade do sistema imune, favorecendo a produção de anticorpos e atuando inclusive sobre as células NK (*natural killer*), que possuem atividade lítica em células tumorais (SFORCIN, 2009).

O mel, em menor grau, também apresenta uma ação antibiótica e os fatores responsáveis por isso são vários, destacando-se a ação de uma enzima, a glucose-oxidase, sintetizada pelas glândulas faríngeas das abelhas e inoculadas no néctar durante seu processamento. Essa enzima é responsável pela formação de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O mel dos meliponíneos é mais líquido, contendo assim uma porcentagem maior de água, o que favorece a ação da glucose-oxidase e a formação desses componentes, que contribuem para a diminuição do pH no meio e torna o ambiente impróprio para proliferação bacteriana (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Em análises de amostras de mel dos meliponíneos constatou-se uma grande atividade bactericida e bacteriostática, com um efeito mais significativo quando comparado ao mel de *Apis mellifera*, que é consumido tradicionalmente em grande escala pela população humana. Dentre as amostras analisadas, 40% do mel das abelhas nativas apresentaram esses efeitos, contra 30% do mel da abelha africanizada (CORTOPASSI-LAURINO e GELLI, 1991), confirmando seu potencial já difundido na cultura popular, como sendo um produto medicinal.

Todos esses fatores nos mostram o nível de importância da presença das abelhas e a abrangência de setores nos quais elas interferem, devendo ocupar uma posição destacada nos propósitos de sustentabilidade dos dias atuais em que observamos frequentemente o abuso e a depredação dos recursos florestais em ritmo acelerado.

1.7 PRODUÇÃO ARTIFICIAL DE RAINHAS

A meliponicultura tem crescido no Brasil nos últimos anos e representa, além de uma atividade econômica rentável, um campo promissor para investimento em pesquisas, que são impulsionadas pela demanda de conhecimento e desenvolvimento de técnicas aplicáveis ao aprimoramento da criação racional das abelhas sem ferrão.

Além disso, a função importante exercida pelas abelhas na polinização tem chamado a atenção para seu uso na prática agrícola, a exemplo das espécies cuja utilização em agricultura já está estabelecida, como *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* (VELTHUIS, 2002).

Entretanto, a utilização de espécies exóticas é encarada com cautela por apresentar um risco potencial de prejuízo à fauna nativa, principalmente pela competição por alimento, locais de nidificação e introdução de doenças (VELTHUIS, 2002; WINTER e cols. 2006)

Nesse contexto, alguns trabalhos têm sido direcionados à aquisição de conhecimento básico sobre a biologia dos insetos que embasem técnicas de manejo envolvendo a fauna nativa, em especial os meliponíneos, por formarem colônias perenes e com muitos indivíduos.

Para que a oferta de colmeias atenda a essas expectativas, o ponto principal discutido é a multiplicação dos ninhos em um intervalo de tempo menor e, nesta etapa, a obtenção artificial de rainhas mostra-se como estratégia crucial.

Como já referido, as espécies pertencentes ao grupo dos trigoniformes têm suas castas definidas pela quantidade de alimentação recebida durante a fase larval. Assim, é possível obter-se rainhas artificialmente induzindo o mecanismo natural através da manipulação do alimento larval, fornecendo uma quantidade extra de alimento para as larvas.

A etapa de obtenção artificial das rainhas dessas abelhas em laboratório já tem uma base de conhecimentos sólidos que suportam as expectativas, apesar de que melhorias podem surgir, especificamente em relação à diminuição da taxa de mortalidade das larvas durante seu desenvolvimento em laboratório.

A principal etapa a ser melhorada é o processo de montagem das minicolônias, em que também ocorre uma perda grande de rainhas por motivos diversos, principalmente pela agressividade das operárias na recusa da rainha

introduzida, ou, simplesmente por estas saírem das caixas para o voo nupcial e não retornarem.

BAPTISTELLA (2009) obteve uma taxa de aquisição de ninhos novos, com sucesso na fecundação natural das rainhas e estabelecimento da colônia, em torno de 10% com *Frieseomelitta varia*; MENEZES (2010) obteve 23% com *Scaptotrigona aff. depilis*; e PRATO (2011) em torno de 19% com *Tetragonisca angustula*.

Os trabalhos recentes envolvendo essa técnica contribuíram com a adição de dados importantes sobre as espécies envolvidas, demonstrando as peculiaridades de cada uma e um grau de sucesso relevante na multiplicação induzida das colônias, com vantagens relativas ao método usual praticado pelos meliponicultores.

Uma técnica ainda não testada é a fecundação *in vitro* dessas rainhas de meliponíneos, cujo efeito seria extremamente positivo se fosse estabelecido, assim como é feito com abelhas da tribo Apini.

Em *Apis*, a técnica de inseminação artificial é praticada com sucesso desde a década de 1940, sendo possível através da abertura instrumental das placas abdominais e deposição do esperma, previamente coletado de vários zangões, no oviduto médio (CARANTÓN e cols., 2010).

Em rainhas de meliponíneos, a dificuldade para isso está no impedimento de acesso às estruturas do aparelho reprodutivo, com chances de ocorrerem danos internos.

1.8 A ESPÉCIE EM FOCO

1.8.1 Características gerais de *Tetragona clavipes*

O presente trabalho tem como objeto de estudo a espécie *Tetragona clavipes*, descrita no ano de 1804 pelo pesquisador dinamarquês Johann Christian Fabricius. Ela pertence ao grupo dos meliponíneos trigoniformes e encontra-se amplamente distribuída desde o estado do Amapá até o Paraná (SILVEIRA e cols., 2002).

O gênero *Tetragona* (Lepeletier & Serville, 1828) ocupa regiões desde o México até o sudeste do Brasil, compreendendo dezesseis espécies concentradas na maior parte da área amazônica (MICHENER, 2007). De acordo com o Catálogo de Abelhas Moure (CAMARGO e PEDRO, 2008), além de *T. clavipes* mais oito espécies estão descritas em território brasileiro: *T. dorsalis* (Smith, 1854), *T. essequiboensis* (Schwarz, 1940), *T. goettei* (Fries, 1900), *T. handlirschii* (Fries, 1900), *T. kaieteurensis* (Schwarz, 1938), *T. truncata* (Moure, 1971) e *T. ziegleri* (Fries, 1900) e *T. quadrangula* (Lepeletier, 1836).

Na cultura indígena da Mata Atlântica, a espécie é conhecida como *Ei pytã* pelos índios guarani *m'byá*, devido à sua aparência avermelhada, pois *pytã*, no dialeto *m'byá*, significa vermelho. Porém o nome mais popular é Borá, ou Vorá, derivado do termo "*hebora*", que no idioma tupi significa "*o que há de ter (mel)*" (RODRIGUES, 2005).

As operárias possuem o corpo com 6 a 8 mm de comprimento, cor dourada e abdômen com listras pretas; têm comportamento territorialista e são defensivas, mordendo e depositando resina em quem se aproxima muito ou interfere em seu ninho, que é construído em cavidades dos troncos de árvores vivas (anexo II). Já foi observada nidificando em alicerce de pedra dentro do *campus* da USP, em Ribeirão Preto.

O tubo para a entrada do ninho é construído com a deposição de resinas vegetais e tem uma aparência disforme, que endurece com o passar do tempo, geralmente com aberturas verticais e uma inclinação da borda que funciona como plataforma de pouso (figura 6a).

Figura 6. a) Entrada do ninho de *Tetragona clavipes*, construído em cavidade no tronco de uma árvore; b) Vista superior da área de cria em ninho estabelecido em caixa de criação racional (a camada superior do invólucro está removida).

Assim como em outras espécies do seu grupo, os discos de cria são construídos em formato helicoidal (figura 6b), isolados e protegidos pelo invólucro de cera. O alimento (pólen e mel) é estocado separadamente em potes de cerume com cerca de três a quatro centímetros de altura cada (figura 7), construídos ao redor do invólucro.

Figura 7. Potes com alimento armazenado: a) mel e b) pólen, dentro de melgueiras.

Por formarem colônias populosas, é uma espécie que coleta e armazena uma grande quantidade de néctar, pólen e resinas vegetais (própolis) (figura 8), tendo assim um potencial relevante para o fornecimento desses produtos em escala comercial, além da cera.

A diferenciação entre os indivíduos machos e fêmeas pode ser feita facilmente a olho nu quando estes são adultos, através da comparação das cores e do seu comportamento. Os machos têm o corpo e as asas escurecidos e posicionam-se imóveis ao redor dos ninhos, quando formam as agregações, que é um comportamento comum de meliponíneos na época de enxameação (figuras 9a e 9b).

Figura 8. Operárias de *T. clavipes* manipulando resina no interior da colmeia.

Figura 9. a) Agregação de machos em um ninho órfão; b) Macho pousado próximo à colmeia; c) Operária construindo célula de cria, no interior do ninho.

As operárias possuem coloração mais clara, com corbículas bem desenvolvidas e a extremidade distal das asas mais clara (figuras 8 e 9c). As rainhas têm a mesma coloração das operárias, porém com cabeça e olhos menores e ausência de corbículas.

O aparecimento de indivíduos machos é condicionado ao aporte de alimento disponível na colônia. Em meliponíneos, pode ocorrer em várias épocas durante o ano, porém, com uma variação sazonal conforme já relatado para várias espécies (PRATO, 2011).

Assim, em determinadas épocas, o número de machos pode aumentar devido à oferta crescente de flores no ambiente e é nesse período que observamos a maior concentração deles, quando ocorre uma agregação (CORTOPASSI-LAURINO, 2007).

Este fator é importante no contexto da obtenção artificial de rainhas em grande escala, pois os machos são essenciais para o sucesso na fundação de um ninho a partir do seu acasalamento com a rainha, o que influencia na multiplicação dos ninhos através da formação de minicolônias.

1.8.2 Ocorrência natural de fungos nas células de cria de *T. clavipes*

Amostras do mel de *T. clavipes* mostraram-se livres da presença de coliformes totais e contagem para bolores e leveduras menores que 100 UFC.g^{-1} , enquanto outros méis de meliponíneos apresentaram contagens superiores para esse tipo de contaminação (ALMEIDA-ANACLETO, 2007).

Um fato observado recentemente em determinadas espécies de meliponíneos, ainda pouco compreendido, é a presença de fungos que se desenvolvem dentro das células de cria e que não causam danos aparentes para as larvas, mas, ao contrário disso, às servem de alimento em determinada etapa de seu crescimento, conforme já descrito para a espécie *Scaptotrigona aff. depilis* (MENEZES, 2010).

Em *T. clavipes* também ocorre a presença de um fungo nas mesmas condições (figura 10), aparentemente diferente do relacionado com a espécie *S. aff. depilis*. Até a elaboração deste estudo sua ocorrência não havia sido mencionada na literatura.

Figura 10. Hifas de fungo nas bordas internas das células de cria de *T. clavipes*.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Adequar a técnica de obtenção artificial de rainhas à espécie *Tetragona clavipes*.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar o volume de alimento larval necessário para o desenvolvimento larval da rainha de *T. clavipes*;
- Obter artificialmente rainhas de *T. clavipes* e estabelecê-las em minicolônias, aguardando sua fecundação natural;
- Analisar a viabilidade do estabelecimento das minicolônias.

A espécie *T. clavipes* pertence a um grupo importante de agentes polinizadores da flora brasileira (anexo I) e sua criação racional oferece um potencial elevado no incremento da produção de cultivares, servindo ainda para pesquisas científicas, programas conservacionistas, de educação ambiental e manejo sustentável.

Assim, o presente trabalho visa aprimorar a técnica de multiplicação artificial de suas colônias e estabelecer parâmetros que aumentem o sucesso da sua criação racional. Isso contribuiria também para a manutenção da população silvestre da espécie que, entre outras, participa da cadeia alimentar através do serviço de polinização, processo essencial para a manutenção de ecossistemas.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aquisição de colônias de *Tetragona clavipes*

As colmeias utilizadas durante a pesquisa foram estabelecidas em caixas padronizadas para a criação racional de meliponíneos a partir de ninhos naturais, que estavam em troncos de árvores já cortadas dentro do *campus* da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto.

Dos onze ninhos de *T. clavipes* que foram transferidos para as caixas de criação racional, cinco não se estabeleceram, principalmente pela infestação de forídeos durante o procedimento, restando apenas seis colmeias para servirem à pesquisa.

O experimento foi conduzido no bloco A do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As colmeias foram alocadas em um meliponário existente no entorno do BL A (figura 11), onde há também uma trilha com diversas colmeias racionais de outros meliponíneos. Após um período de adaptação das abelhas dentro das colmeias, a aquisição dos dados iniciou-se pela coleta dos discos de cria novos nos ninhos mais populosos.

Figura 11. a) Colmeia com ninho de *T. clavipes*; b) Entrada do ninho.

3.2 Coleta e aferição do volume de alimento larval das células de cria

Na bancada do laboratório, com os discos de cria dispostos em placas de Petri, cada célula foi desoperculada e o alimento larval foi coletado usando-se um micropipetador manual com capilares graduados (figuras 12a e 12b). Nesta etapa, o volume de alimento larval contido em cada célula foi quantificado, tanto das células de cria de onde emergem as operárias e os machos bem como de células reais.

A coleta do alimento foi feita com uso de pipetas automáticas (figura 12d) e em seguida foi depositado em microtubos (figura 12e) ou tubos de 15 mL, sendo utilizado instantaneamente para criação de larvas *in vitro* ou, quando necessário, armazenado a - 20° C.

Figura 12. a) Micropipetador usado durante a medição do volume de alimento larval contido nas células de cria; b) Capilar graduado com alimento coletado; c) Células de cria desoperculadas, contendo alimento larval e ovos; d) Coleta do alimento larval; e) Alimento armazenado em microtubo de 1,5 mL.

3.3 Distribuição do alimento larval nas células artificiais e criação das larvas

As larvas foram criadas em placas de acrílico que são comumente usadas em testes ELISA e, aqui, funcionaram como células de cria artificiais. São descartáveis, mas, para esta finalidade, foram reutilizadas em algumas vezes, sendo então esterilizadas em cuba com lâmpada germicida de 15W (luz ultravioleta) por dez minutos (figura 13), antes de receberem o alimento larval.

Figura 13. Esterilizador Suya modelo UV Export, com lâmpada germicida de luz ultravioleta.

O alimento larval coletado foi homogeneizado em agitador depois distribuído nos poços das placas com auxílio de pipeta automática (figuras 14a e 14b). Em seguida, as placas foram mantidas a 28° C em estufa para DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), protegidas da dessecação e excesso de luminosidade dentro de recipientes fechados com tampa (figura 14c).

Figura 14. a) Pipeta automática usada para distribuição do alimento nas placas de acrílico; b) Vista lateral do alimento distribuído; c) Placa contendo alimento e dentro de recipiente com umidade relativa controlada.

Na maior parte das vezes, as placas contendo alimento larval distribuído nos poços foram esterilizadas novamente com luz germicida antes da transferência de

ovos ou larvas. Nas tentativas em que esperou-se o aparecimento dos fungos elas não foram esterilizadas.

Discos de cria novos foram coletados de uma colônia doadora e cada célula de cria foi desoperculada cuidadosamente para a transferência dos ovos e/ou larvas, feita com auxílio de um alfinete entomológico dobrado, previamente esterilizado em álcool a 70% e exposto à luz ultravioleta por dez minutos. A seguir, um ovo foi transferido para cada poço da placa, onde permaneceu sobre o alimento na mesma posição em que estava na célula de cria natural (figura 15).

Figura 15. a) Representação do modo de coleta do ovo; b) Vista superior de um ovo transferido; c) Vista lateral de um ovo transferido.

Ao completar-se a transferência dos ovos, a placa foi protegida novamente contra perda de umidade e excesso de luz e devolvida à estufa, sendo mantida a 28° C e inspecionada diariamente.

Nos primeiros dias de desenvolvimento das larvas, a umidade relativa foi mantida em torno de 100% (com uso de água destilada no interior do recipiente onde estava a placa) e foi baixada para cerca de 75% ao término da fase de alimentação, quando as larvas começaram a tecer o casulo, evitando assim o acúmulo de água nos poços e a morte das larvas por afogamento.

Esse ajuste pode ser alcançado pela substituição da água destilada por uma solução salina saturada, neste caso, com cloreto de sódio (NaCl) (WINSTON e BATES, 1960; MENEZES, 2010).

Buscando caracterizar o limite necessário de alimento larval ingerido para a diferenciação das castas em *T. clavipes*, operárias e rainhas foram produzidas com quantidades diferentes de alimento larval.

Após a emergência, as abelhas foram pesadas em balança eletrônica de precisão Mettler (AE50) e as rainhas foram marcadas no tórax, com tinta não tóxica (figura 16).

Figura 16. Rainha de *Tetragona clavipes* recém emergida, obtida artificialmente.

As abelhas obtidas artificialmente que não foram usadas para a formação de minicolônias foram sacrificadas por congelamento, fixadas com uso de solução de Dietrich (600 mL de álcool etílico 96° + 300 mL de água destilada + 100mL de formol a 40% e 20 mL de ácido acético) e conservadas em álcool etílico a 70%.

3.4 Montagem e análise do desenvolvimento de minicolônias

A partir do sucesso na obtenção artificial das rainhas, seguiu-se a montagem de minicolônias utilizando-se pequenas caixas de madeira com tampas transparentes.

No primeiro experimento, foram montadas dez minicolônias. Além das rainhas obtidas artificialmente, alguns discos de cria em estágio avançado de desenvolvimento mais cerca de cinquenta operárias jovens (retiradas de uma colônia doadora) foram mantidas nas caixas (figura 17) e fechadas por cerca de 10 dias dentro da estufa D.B.O. a 28° C. As abelhas foram alimentadas com mel da própria espécie e uma mistura deste com xarope (água e açúcar 1:1), além de pólen fermentado.

O desenvolvimento das minicolônias foi monitorado diariamente para observação do comportamento de aceitação entre as operárias e a rainha, sendo levadas posteriormente para o meliponário e mantidas com alimentação suplementar, a fim de facilitar o seu estabelecimento nas caixas.

Figura 17. Vista superior da minicolônia, com tampa de vidro levantada.

No segundo experimento, dez minicolônias foram montadas em caixas com temperatura controlada por aquecimento elétrico através do uso de resistores e termostato, baseado em COSTA e VENTURIERI (2007).

Primeiramente, as rainhas obtidas foram agregadas individualmente com cerca de cinquenta operárias jovens em caixas usadas para coleções entomológicas e foram mantidas assim em estufa por uma semana (figura 18). Em seguida, cada grupo foi liberado nas caixas de madeira e estas foram colocadas dentro de caixas de isopor (figura 19).

Figura 18. a) e b) Rainha marcada junto com operárias jovens; c) Caixas contendo um grupo de operárias jovens e uma rainha em cada.

Figura 19. Conjunto de caixas ligadas em paralelo a sistema elétrico com termostato.

Nas situações em que as rainhas não foram aceitas pelas operárias ou não retornaram para a minicolônia, rainhas naturais foram introduzidas nas caixas, provenientes de células reais coletadas nas colônias doadoras.

Rainhas adultas obtidas em laboratório também foram introduzidas em minicolônias com operárias já adultas. Neste caso, as rainhas foram colocadas dentro de pequenas “gaiolas” feitas com malha de aço ou tubos de centrífuga com orifícios e introduzidas nas caixas, a fim de protegê-las da agressividade das operárias, sendo liberadas depois de um ou dois dias.

Na terceira tentativa, cinco minicolônias foram montadas usando-se o mesmo sistema de aquecimento elétrico. Neste caso, foram usadas cerca de duzentas operárias para cada minicolônia e as operárias foram colocadas diretamente nas caixas de madeira, juntamente com um disco de cria em cada uma.

Durante um período de duas semanas, as operárias foram mantidas sem a presença de rainha, sendo alimentadas regularmente até o momento em que começaram a construir um invólucro de cerume e as primeiras células de cria.

Desta vez, as rainhas obtidas no laboratório foram marcadas e introduzidas nas minicolônias em fase de pupa pigmentada, a poucos dias do momento correspondente à sua emergência, sendo colocadas em cápsulas feitas com cerume da própria minicolônia. Assim, elas emergiram diretamente nas caixas.

3.5 Análise de asas com uso de morfometria geométrica

A fim de caracterizar e averiguar uma variação possível dos padrões no desenvolvimento das castas, as asas das rainhas e das operárias obtidas em laboratório foram comparadas entre si, bem como com asas de operárias naturais de dezenove ninhos.

Essa comparação é feita através das fotos das asas, em que são identificados os marcos anatômicos de regiões homólogas, neste caso, usando os pontos de cruzamento ou contato das veias da asa anterior (figura 20). Assim, é possível criar um mapa com as coordenadas cartesianas dos pontos relativos a cada marco anatômico das asas dos indivíduos amostrados, permitindo a comparação e identificação de diferenças sutis no padrão de venação.

Figura 20. Foto da asa anterior de rainha de *T. clavipes* obtida em laboratório, sob aumento de 20x em lupa. Os pontos assinalados foram utilizados como referência para a análise de morfometria geométrica.

As asas das abelhas, que estavam fixadas e mantidas em álcool a 70%, foram retiradas com auxílio de pinça histológica, montadas em lâminas de microscopia ótica e fotografadas com uso de lupa sob aumento de vinte vezes. Foram analisadas as asas anteriores esquerdas de 200 operárias e 35 rainhas.

Dez marcos anatômicos foram posicionados entre as junções das nervuras usando o programa de computador tpsDIG2 (versão 2.16). Depois da marcação dos pontos em todas as fotos, o programa gerou uma matriz de dados com as coordenadas cartesianas referentes aos marcos anatômicos de cada asa e, a partir desses dados, gerou um banco de entrada (arquivo .tps) para o programa MorphoJ, versão 1.04a.

Os programas são de acesso livre e foram baixados através do endereço eletrônico <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>.

Com a matriz de covariância, gerada pelo MorphoJ, foi feita a análise entre os componentes principais (PCA) que apresentaram variação da forma. Essa análise se baseia na diferença da configuração da posição relativa entre os marcos anatômicos homólogos, que são reconstruídos graficamente pelo programa.

Primeiramente é feita uma sobreposição das imagens, seguida pelo seu redimensionamento e sua rotação, conforme o seu centroide, a fim de que todas sejam alinhadas e tenham um tamanho único, eliminando assim a influência de medidas lineares para a correlação dos pontos.

A seguir, as posições de cada ponto homólogo são testadas em busca da menor distância entre eles, chegando-se a um ponto consenso. A diferença entre as distâncias de cada ponto homólogo amostrado e o ponto homólogo do consenso gera os chamados resíduos de Procrustes, que são analisados estatisticamente.

Os resultados foram mostrados em três tipos de gráficos: dispersão dos valores do componente principal (PC scores); mudança de forma do componente principal (PC shape changes) e a porcentagem da variância total para cada componente principal (Eigenvalues).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento dos ninhos de *T. clavipes* que foram transferidos

Onze colônias foram transferidas para caixas de criação racional, padronizadas em 15 cm x 15 cm x 6 cm de volume interno em cada alça (figura 21a). Após as transferências, cinco colônias foram perdidas devido à infestação por forídeos (figura 21b).

Figura 21: a) Colônia de *T. clavipes* estabelecida em caixa para criação racional, durante manutenção do ninho; b) Pupas de forídeos no fundo de outro ninho, que foi infestado pelas moscas após ter sido transferido.

4.2 Volume de alimento larval encontrado nas células de cria

Para o cálculo estatístico e geração dos gráficos nesta seção, referentes aos valores dos volumes de alimento larval e peso das abelhas, foi utilizado o programa Statistica (versão 7), com as atribuições da média, média com desvio padrão e indicação de valores mínimo/máximo.

Buscando estabelecer parâmetros necessários para obtenção artificial das rainhas de *T. clavipes* em laboratório, o volume de alimento larval das células de cria foi quantificado.

Nas células de cria onde se desenvolvem larvas das futuras operárias e dos machos houve uma variação da quantidade de alimento depositado em épocas diferentes do ano (gráfico 1).

Gráfico 1: Amostragem do volume de alimento larval encontrado em células de cria de *T. clavipes*. (n=50)

Gráfico 2. Comparação entre o volume de alimento larval encontrado em células de cria de *T. clavipes*. (Operárias e machos, N= 200; Células reais, N= 10)

Figura 22: Comparação entre o volume de alimento larval encontrado nas células de cria: a) vista superior; b) conteúdo das respectivas células transferido para microtubos de 0,5 mL;

Foi constatado também que, em média, as células reais contêm cerca de 3,8 vezes (podendo chegar a cinco vezes) o volume de alimento larval que é encontrado em cada uma do restante das células de cria (gráfico 2 e figura 22). O valor médio encontrado nas células reais foi de 107 μ L e nas demais células de cria foi de 30 μ L.

4.3 Criação de larvas e obtenção de rainhas em laboratório

Nas primeiras tentativas em que transferi ovos não obtive sucesso para a criação de larvas, pois os ovos ficaram inviáveis e com aspecto murcho, provavelmente por influência de umidade relativa baixa.

Não foi constatada diferença na utilização do alimento fresco ou congelado para a criação das larvas em laboratório.

Com uso de microeletrodo InLab Micro®, capaz de analisar amostras pequenas, foi medido o pH do alimento larval de células de cria individuais e identificada uma variação natural, que tem caráter ácido e média de 3,25 nas células novas (recém operculadas), com tendência a aumentar durante o tempo em que a larva se desenvolve, chegando a 4,27 em um estágio avançado, quando encontramos a presença do fungo (gráfico 3).

Gráfico 3. Diferença de pH do alimento larval de *T. clavipes* (n= 70).

Em uma das transferências, em que usei larvas com um dia de vida, forneci o volume de 140 μ L de alimento larval e estas mostraram desenvolvimento adequado, terminando o estágio de alimentação com 22 dias após sua transferência. Houve uma perda considerável de larvas que morreram durante a fase de alimentação (34%).

Ocorreu a cristalização do alimento larval em alguns poços da placa, provavelmente devido à diminuição antecipada da umidade relativa. Isso fez com que as larvas ingerissem menos alimento do que o conteúdo colocado no início do processo.

No experimento seguinte, em que ovos foram transferidos e houve sucesso na eclosão de todos, mantive a umidade relativa em torno de 100% até que as larvas tivessem ingerido todo o alimento larval.

Em condições laboratoriais, o volume limite de alimento fornecido para as larvas foi de 110 μ L. Em quantidades maiores que esta elas não terminaram a fase de alimentação e todas morreram antes da fase em que tecem a seda, com alimento sobrando nos poços (figura 23).

Figura 23. Larvas comendo alimento em excesso, antes de morrerem.

Até então, a maior transferência de larvas havia sido feita usando-se volumes de 120 μL e 130 μL de alimento larval, o que ocasionou grande perda de material e tempo. Entretanto, oferecendo 90 μL , 100 μL e 110 μL , sob o mesmo tratamento para controle da umidade relativa, obtive taxas importantes de sucesso na obtenção de rainhas neste experimento (tabela I).

Tabela 1. Taxa de natalidade na obtenção artificial de rainhas usando volumes diferentes de alimento larval (n=20).

Volume de alimento larval usado (μL)	Porcentagem de rainhas obtidas
90	90 %
100	100 %
110	80 %
120	0
130	0

Foi observada uma variação do peso, assim que as abelhas emergiram, para o mesmo volume de alimento larval fornecido (gráficos 4 e 5a); variação que foi mantida mesmo depois de alguns dias, quando o peso tende a estabilizar (gráfico 5b).

Gráfico 4. Variação individual do peso das rainhas obtidas com 100 μL de alimento larval.

Gráfico 5. Variação do peso médio das rainhas obtidas com volumes diferentes de alimento larval. a) ao emergir; b) após 3 dias de vida. (n=14).

Nas transferências seguintes, o volume de alimento larval usado para obtenção de rainhas foi focado em 100 µL, pois é próximo à média do volume encontrado em células reais, como já mostrado no gráfico 2.

Em outro experimento, a partir de volumes de alimento larval fornecido em quantidades gradativas, foi possível chegar ao ponto limiar da diferenciação das castas de *T. clavipes*, que fica entre 45 µL e 50 µL. Usando-se estes volumes de alimento larval, emergiram tanto operárias quanto rainhas e, a partir de 60 µL, somente rainhas. Houve uma variação do tempo de desenvolvimento das larvas para a mesma quantidade de alimento larval ingerido, bem como uma sobreposição de fases em cada grupo (gráfico 6 e figura 24).

Gráfico 6. Duração de cada estágio do desenvolvimento das larvas de *T. clavipes*, para volumes diferentes de alimentação. (n=15)

Figura 24: Estágios do desenvolvimento de *T. clavipes* durante criação artificial de suas larvas.

Neste experimento, o peso entre as abelhas recém emergidas também apresentou variação (gráfico 7).

Gráfico 7. Variação do peso de abelhas recém emergidas conforme os volumes diferentes de alimento larval fornecido às larvas. (n=15). (* Peso de operárias naturais)

Na maior parte dos experimentos com criação de larvas houve um alto índice de sucesso para as transferências de ovos, com 100% de eclosão. No entanto, apesar do desenvolvimento adequado nos primeiros dias, muitas larvas morreram em fases distintas do desenvolvimento sem que fosse identificada a causa. A taxa de mortalidade nesses casos chegou a 60% em algumas tentativas e a média geral foi de 40%.

O alimento larval de outra espécie de abelha sem ferrão, *Scaptotrigona bipunctata*, também foi testado como alternativa para criação das larvas de *T. clavipes*. Os 96 ovos que foram transferidos eclodiram normalmente e as larvas começaram a se alimentar, entretanto, todas morreram dentro de 2 dias (figura 25).

Figura 25: Larvas de *T. clavipes* mortas, após ingerirem alimento de *Scaptotrigona bipunctata*.

4.4 Montagem das minicolônias

As rainhas colocadas nas dez minicolônias durante a primeira tentativa não foram fecundadas e, portanto, não houve fundação de novos ninhos por motivos diferentes.

Três dos ninhos foram invadidos por formigas, apesar da proteção instalada na base das caixas, que não surtiu efeito. Nos outros sete ninhos as rainhas não foram mais encontradas dentro das minicolônias depois de cerca de duas semanas.

Uma minicolônia com aquecimento controlado por resistência e termostato foi montada em sala de observação (figura 26). Neste caso, usei cerca de 100 operárias mais discos de cria com uma célula real. A fecundação da rainha ocorreu dentro de 25 dias após a sua emergência, quando as primeiras células de cria com ovos foram observadas (figura 27).

Figura 26. a) Vista superior; b) Sistema de aquecimento montado e tubo para acesso das abelhas atravessando a parede; c) Extremidade do tubo fora da sala de observação.

Figura 27. a) Rainha natural fecundada em fase inicial de postura; b) e c) Primeiras células de cria com ovos; d) Seta indicando o ovo.

Após dois meses a minicolônia estava bem estruturada e a rainha com postura de ovos constante (figura 28), mas ainda sendo mantida com alimentação suplementar. Nesse período, alguns discos de cria foram retirados de uma colônia populosa e introduzidos na minicolônia, a fim de aumentar o número de operárias emergentes e fortalecer a minicolônia.

Depois de seis meses foi encontrada a primeira célula real nessa minicolônia, com volume de alimento larval de 88 μ L, valor abaixo da média para esta espécie.

Figura 28: a) Vista superior da minicolônia, com parte do invólucro removido mostrando as células de cria e potes de alimento; b) Células de cria novas.

No segundo experimento, apenas uma das minicolônias permaneceu com abelhas e no restante as operárias abandonaram as caixas. A caixa cujas operárias permaneceram ativas foi mantida com cerca de duzentas operárias, mais disco de cria com abelhas prestes a emergir e uma célula real.

Após a emergência, a rainha foi fecundada dentro de 20 dias e as primeiras células com ovos foram observadas após uma semana (figura 29). A partir daí o

ninho foi acompanhado e permaneceu estável, com alimentação suplementar semanal.

Figura 29: a) Uma das caixas de isopor onde as minicolônias foram introduzidas e mantidas com temperatura mínima controlada por termostato, em 28 °C; b) Minicolônia no interior de caixa de isopor, tampada com folha de acetato transparente; c) Primeiras células de cria com ovos; d) Células de cria após uma semana da fecundação da rainha.

Durante a terceira tentativa para formação de minicolônias, a estratégia utilizada para aceitação das rainhas foi introduzi-las ainda em estágio de pupa, o que funcionou nas cinco caixas montadas e não foi observada nenhuma agressividade das operárias. As rainhas já estavam marcadas e foi possível observá-las circulando e interagindo com as operárias durante todo o tempo em que ficaram nas caixas.

Em uma das caixas, apesar de ter ocorrido a aceitação da rainha, depois de uma semana foi observado o comportamento agressivo de algumas operárias. Nessa circunstância a rainha ficou desorientada, fugindo e batendo as asas.

Após três semanas as rainhas não foram mais encontradas nas caixas.

4.5 Tentativa de cultivo do fungo em laboratório

Buscando identificar o tipo de fungo que ocorre naturalmente nas células de cria de *T. clavipes*, foi tentado o seu cultivo em meio Agar Dextrose de Sabouraud com alimento larval das abelhas, porém, sem sucesso.

Em condições artificiais, um tipo de fungo com hifas semelhantes desenvolveu-se em apenas em um dos poços onde a larva transferida havia morrido (figura 30) e não seguiu o padrão observado na condição natural do ninho, pois suas hifas cresceram sobre a superfície do alimento larval e se alastrou para a lateral dos poços, alcançando parte do alimento que havia cristalizado.

Neste caso, o fungo também não foi identificado e não sabemos se era do mesmo tipo que é encontrado nas células de cria naturais, já que em nenhum deles foi possível seu isolamento no meio de cultivo testado.

Figura 30. a) Hifas de fungo crescendo sobre a superfície do alimento larval após 12 dias da transferência de larvas; b) Seta indicando a larva morta; c) O mesmo poço no 15º dia; e d) 16º dia.

4.6 Diferenças no padrão da venação em asas das castas de *Tetragona clavipes*

A análise por morfometria geométrica revelou que as castas de *T. clavipes* apresentam diferenças significantes em relação ao padrão de venação das asas anteriores. É possível notar uma variação anisotrópica dos resíduos de Procrustes das rainhas, que se distanciam mais da média encontrada nas operárias, cujos resíduos têm variação isotrópica. Os pontos com maior variação foram: 2, 4, 5, 6, 9 e 10 (figura 31).

Figura 31: Resíduos de Procrustes dos 10 marcões anatômicos projetados no contorno da asa de uma operária de *T. clavipes*. Pontos pretos representam os resíduos de Procrustes e os azuis a média dos resíduos.

As análises do componente principal (PCA), a partir dos resíduos de Procrustes das coordenadas cartesianas alinhadas, geraram 16 medidas de deformações relativas (gráfico 8)

Gráfico 8: Porcentagem da variação encontrada nas 16 medidas de deformações relativas dos componentes principais.

A relação entre os componentes principais 1 e 2, que tiveram a maior variação (65, 67% e 11,52, respectivamente), evidenciou a separação dos grupos (gráficos 9 e 10), mostrando que, conforme a gradação do volume de alimento larval, os indivíduos se aproximaram mais do grupo das rainhas (elipse lilás). As operárias naturais formaram um grupo bem definido (elipse azul), e as operárias maiores obtidas em laboratório (elipse laranja) ficaram separadas das operárias naturais.

Gráfico 9: Dispersão dos valores dos componentes principais que apresentaram maior variação em cada indivíduo amostrado, PC1 = 65,67% e PC2 = 11,52%.

Gráfico 10: Transformação em rede do gráfico que mostra a variação na forma do componente principal 1, entre os marcos anatômicos de uma rainha e os do ponto consenso. Os traços em azul escuro são as distâncias relativas de cada marco.

As rainhas menores, que foram obtidas com os volumes de alimento larval correspondente à quantidade limiar da diferenciação de castas para esta espécie (50 μ L), ficaram próximas ao grupo das rainhas maiores, mas formando um grupo intermediário, como mostrado pela elipse verde do gráfico.

Em relação à forma, as rainhas possuem a extremidade distal com formato arredondado e também apresentam um prolongamento de uma das veias, o qual não foi encontrado nas asas de operárias (figura 32).

Figura 32: Desenho do contorno da asa de uma rainha deformado pela sobreposição com o centroide das operárias. Seta indica ramificação de veia observada nas asas das rainhas.

Ao criar abelhas usando volumes diferentes de alimento larval, foi possível caracterizar uma gradação na formação desse ramo de veia, correspondente aos volumes fornecidos às larvas (figura 33).

Figura 33: Microfotografias das asas de *T. clavipes*. Em a) Operária natural; b) Operária obtida em laboratório com 30 μ L de alimento larval; c) 40 μ L (seta indica um vestígio do início de formação da veia); d) 50 μ L; e) 60 μ L; f) 80 μ L, g) 90 μ L; h) 100 μ L. A partir de d) são rainhas.

4.7 Ocorrência de machos gigantes em *Tetragona clavipes*

Para utilização das rainhas naturais na formação de minicolônias, foram feitas coletas ocasionais de células reais em estágio avançado de desenvolvimento, que foram abertas e as pupas contidas nessas células foram transferidas para as placas, mantidas em estufa pelo mesmo procedimento para a criação das larvas.

Das quinze células reais coletadas nessas condições, em três foram encontrados machos gigantes, representando 20 % nessa amostragem. Taxa semelhante à encontrada em outras espécies, como em *Plebeia remota* (ALVES e cols., 2009).

Os machos comuns apresentam características morfológicas distintas das fêmeas, principalmente em relação ao tamanho e formato dos olhos, que são maiores. Nos machos gigantes essa característica é pronunciada (figura 34).

Figura 34: Comparação entre pupas de *T. clavipes* em estágio de pigmentação, onde a) Rainha natural obtida de uma célula real, b) Operária obtida em laboratório usando 40 μ L de alimento larval; c) macho gigante encontrado em célula real. A seta indica uma das corbículas da operária.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Suscetibilidade de *Tetragona clavipes* à infestação por forídeos

Figura 35: a) Forídeo adulto; b) Ovos de forídeos botados dentro do pote de pólen de uma colônia de *T. clavipes* transferida.

Tentamos aquisição de colônias novas a partir da instalação de ninhos armadilha dentro do *campus*, baseando-nos em estudo realizado que indicou os locais mais propícios para capturar enxames de *T. clavipes* (OLIVEIRA, 2009), entretanto sem sucesso.

Sendo assim, os ninhos usados para a pesquisa foram adquiridos por meio de transferências de ninhos retirados de árvores que haviam sido cortadas. Durante as transferências para as caixas de criação racional, observamos a presença constante de moscas forídeas ao redor das caixas enquanto o procedimento era executado (figura 35). Invariavelmente, em todas as transferências tivemos esse problema e depois das primeiras perdas de colônias inteiras, devido à infestação dos ninhos já transferidos, reforçamos os procedimentos de prevenção

durante o manejo a fim de minimizar o risco de novas infestações.

Além das práticas comumente usadas durante esse tipo de procedimento, como a vedação das alças da caixa com fitas adesivas, adotamos medidas preventivas simples: 1) fechamento da colmeia ao entardecer e reabertura depois de dois ou três dias; 2) diminuição da entrada da colmeia, estreitando a passagem de modo que poucas abelhas conseguissem passar e, assim, dificultando também a entrada das moscas; 3) instalação de iscas próximas às colmeias, a fim de desviar o fluxo das moscas para fora e longe do ninho e 4) alimentação para a colônia que foi transferida restrita ao xarope.

A grande quantidade de alimento estocado naturalmente no ninho de *T. clavipes*, principalmente o pólen fermentado e os discos de cria com alimento larval, que são danificados ocasionalmente durante uma transferência, tornam essa espécie de abelha muito suscetível à infestação pelos forídeos. Dessa forma, durante uma transferência de ninho é aconselhável optar pela utilização apenas dos

discos de cria com pupas e larvas em estágio avançado de desenvolvimento e evitar manter discos de cria que contenham alimento larval, além dos procedimentos já citados.

Mesmo em ninhos já estabelecidos nas caixas de criação racional é preciso atenção para a presença das moscas. Neste caso, se a abertura da colmeia é feita para a coleta de alimento larval, que é outro procedimento invasivo para a colônia, o ideal é que seja realizada rapidamente e o alimento larval que tenha escorrido deve ser eliminado, secando-se o local com papel absorvente (figura 36).

Para a retirada de células de cria dos discos construídos em formato helicoidal o procedimento é mais trabalhoso, porque várias células devem ser cortadas e o dano é ainda maior.

Sempre que é feita a retirada de partes dos discos de cria a injúria não se limita às células que foram diretamente danificadas, mas afeta a camada inferior dos discos, onde muitas células ficam expostas. Isso acontece porque as colunas de cerume que sustentam e separam os discos são mais rígidas do que as camadas finas dos opérculos sobre os quais são construídas, dessa forma, quando uma camada de discos é extraída, muitas células são desoperculadas.

Figura 36: a) Disco de cria cortado durante coleta de células; b) Células de cria expostas com alimento larval escorrido.

Nessas circunstâncias as operárias podem coletar o alimento larval das células danificadas rapidamente, entretanto, o alimento que vaza libera seu cheiro característico e é isso que atrai as moscas. Assim, qualquer procedimento preventivo deve ajudar a restabelecer o funcionamento normal do ninho e, nas ocasiões citadas, é necessário sobretudo agilidade para não deixar a colônia vulnerável.

A partir do momento em que adotamos esses procedimentos simples é possível mantermos colônias bem estruturadas e populosas com sucesso.

5.2 Criação das larvas de *Tetragona clavipes* em laboratório

As células de cria ideais para a coleta do alimento larval são as que possuem ovos, pois, assim, o alimento não começou a ser consumido e está íntegro.

Durante o desenvolvimento das larvas, a diminuição da umidade relativa no recipiente onde as placas estão é necessária também para evitar uma possível proliferação de fungos sobre as fezes (que são eliminadas logo que terminam de tecer o casulo), e deve ser feita assim que o alimento foi quase totalmente consumido.

Antes da montagem dos experimentos, o alimento larval foi homogeneizado em agitador para, assim, tentar fornecê-lo com a mesma concentração de nutrientes entre as larvas.

A quantidade de alimento ingerido pela larva influencia o peso e o tamanho que a abelha atinge quando se torna adulta, esperando-se que isso seja uma relação diretamente proporcional. Porém, em todos os experimentos em que foi fornecida a mesma quantidade de alimento houve diferenças do peso das abelhas ao emergir. Também foi observada uma sobreposição de fases durante o desenvolvimento das larvas que receberam o mesmo volume de alimento (gráfico 6).

Possivelmente, o que ocasionou essa sobreposição de fases foi determinado pela utilização de ovos em idades distintas. Os ovos eclodiram entre 5 e 7 dias após as transferências, o que refletiu na diferença do início da alimentação pois algumas larvas começaram a consumir o alimento antes que outras.

Uma característica que poderia influenciar nesses dois aspectos (sobreposição de fases de desenvolvimento e diferença do peso ao emergir) seria o próprio metabolismo de cada larva. Supondo-se que exista tal variação, cada larva poderia apresentar velocidades diferentes no tempo de crescimento e/ou assimilação de nutrientes.

Para refinar esses dados seria necessário acompanhar o desenvolvimento de larvas a partir de ovos com eclosão simultânea, o que não foi testado.

Optei por utilizar ovos por ser um procedimento mais fácil para coleta e assim pude obter uma resposta aos valores exatos de alimentação fornecida às larvas. No entanto, se larvas com um dia de vida são utilizadas para obtenção de rainhas, o tempo do desenvolvimento é reduzido em média sete dias, período máximo para que ocorra a eclosão dos ovos.

Em algumas espécies de trigoniformes ocorre o surgimento de rainhas miniatura, provenientes não de células reais, mas das células comuns ao desenvolvimento de operárias e machos. São rainhas autênticas que podem ser fecundadas e assumirem a função de reprodução da colônia, apenas com tamanho do corpo menor. Os mecanismos envolvidos nesse processo não estão esclarecidos e algumas hipóteses foram levantadas que buscam explicar esse fenômeno, podendo ser uma estratégia de sobrevivência da colônia, em caso da rainha (mãe) morrer; ou tratar-se simplesmente de um erro durante o desenvolvimento da larva, ou ainda, pela teoria de autodeterminação de castas (BOURKE e RATNIEKS, 1999; RATNIEKS, 2001), que sugere que a larva tem autonomia para escolher em diferenciar-se numa rainha.

Em experimentos feitos com *Scaptotrigona aff. depilis*, CABRAL (2009) obteve rainhas miniatura a partir da mesma quantidade de alimento larval observada nas células de cria em que se desenvolvem as operárias e os machos (32 μ L), sugerindo que outro fator influenciou a diferenciação das castas. Entretanto, análises comparativas sobre os níveis de expressão gênica neste estudo não indicaram o que poderia ter influenciado esse resultado.

No aspecto da obtenção artificial de rainhas para multiplicação dos ninhos, o que deve ser considerado é o tempo de desenvolvimento para que se obtenha uma rainha funcional e apta ao acasalamento, uma vez que o objetivo seja a aceleração do processo. Larvas alimentadas com menos alimento também levam um tempo menor para chegarem ao estágio adulto, quando comparadas às rainhas obtidas com os valores máximos possíveis de alimentação, com intervalo de alguns dias para emergir.

Dessa forma, se a obtenção de rainhas menores se mostrar eficiente na fundação dos ninhos, tornar-se-á uma estratégia vantajosa para quem busca colmeias rapidamente e em larga escala. Rainhas criadas com 100 μ L de alimento levaram em média 90 dias para emergir, enquanto as que receberam 60 ou 70 μ L emergiram antes de 70 dias, desde a transferência do ovo.

Por outro lado, rainhas maiores poderiam ser reprodutoras mais efetivas, com capacidade maior de postura de ovos. Para confirmar essa hipótese são necessárias análises comparativas entre a fecundidade das rainhas, aspecto não explorado neste trabalho.

Durante a criação das larvas foi constante a mortalidade em estágios avançados de desenvolvimento e em momentos diversos, sem que um fator evidente tenha sido identificado que pudesse explicar isso. Houve casos em que todos os ovos transferidos eclodiram e as larvas se desenvolveram normalmente durante todo o estágio de alimentação, quando muitas morreram antes de tecer a seda ou depois de defecarem (figura 37).

Figura 37: Larvas que morreram em estágios de desenvolvimento distintos. Em I), II) e III) enquanto se alimentavam; IV) após ter ingerido todo o alimento; V) e VI) após defecarem.

Podemos supor que uma possível contaminação do alimento pudesse afetar todas as larvas, pois sempre foi homogeneizado antes da transferência para as placas. Entretanto, isso foi estranho particularmente nas vezes em que muitas larvas morreram e várias outras estavam se desenvolvendo normalmente ao mesmo tempo em poços vizinhos, na mesma placa.

Algum fator presente no alimento larval ou no material das placas utilizadas poderia ter influenciado na taxa alta de mortalidade que obtive em alguns experimentos, que chegou a 60%.

Além disso, as condições artificiais em que as larvas são criadas não reproduzem fielmente o ambiente interno da colônia, sendo assim, as influências nesse meio podem causar um desequilíbrio da interação entre a larva e a flora microbiana própria do alimento larval, provocando a morte das larvas.

A relação das larvas com a flora microbiana específica poderia revelar uma interdependência. PRATO (2011) conseguiu criar larvas de *Tetragonisca angustula* utilizando o alimento larval de outra abelha sem ferrão, *Scaptotrigona aff. depilis*, apesar de ter identificado perfis proteicos diferentes entre os alimentos larvais das duas espécies.

Entretanto, essa estratégia não foi eficaz quando alimentei larvas de *T. clavipes* com alimento larval de *Scaptotrigona bipunctata*, pois as larvas morreram logo no início da fase de alimentação, depois de dois dias da eclosão do ovo (figura 25). Isso nos indica que pode existir uma forte dependência das larvas em relação às características de cada alimento larval, próprio de cada espécie.

A comparação do pH do alimento larval entre células de cria de *S. bipunctata* e *T. clavipes*, recém operculadas, mostrou diferença significativa, o que pode ter influenciado na morte das larvas (gráfico 11).

Gráfico 11: Variação entre o pH do alimento larval em células de cria recém operculadas de *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragona clavipes*. (n= 20)

5.3 Montagem das minicolônias

Após as transferências mal sucedidas de ninhos, o número de colônias disponíveis para os experimentos ficou reduzido e ocasionou um atraso na pesquisa, pois foi necessário mais tempo até que outras colônias estivessem estabelecidas e aptas para doarem material, tanto no que se refere à coleta de alimento larval como na captura de operárias usadas na montagem das minicolônias. Foi possível estabelecer seis ninhos de forma adequada para o início dos experimentos.

Na primeira e na segunda tentativa em que as minicolônias foram montadas, usei operárias recém emergidas e isso facilitou a aceitação das rainhas introduzidas. Porém, nas caixas que não foram invadidas por formigas e permaneceram com abelhas, no primeiro experimento, as rainhas não foram mais encontradas, provavelmente se perderam no ambiente ou foram predadas quando saíram das caixas.

Com o material dessas caixas montei uma minicolônia com temperatura controlada em sala de observação, com cerca de cem operárias e uma célula real. Enquanto a rainha da célula real não emergiu, tentei por duas vezes a introdução de rainhas marcadas, que foram obtidas em laboratório, sem sucesso na aceitação e assim esperei a emergência da rainha natural.

Após a emergência, a rainha foi fecundada dentro de vinte e cinco dias, quando foram observadas as primeiras células de cria com ovos.

Nesse primeiro ninho fundado a partir de uma minicolônia, foi encontrada uma célula real após cerca de três meses, com volume de alimento larval de 88 μL , um valor abaixo da média que foi encontrada em colmeias de *T. clavipes* bem estabelecidas.

Na segunda tentativa, em que foram montadas dez minicolônias com sistema de aquecimento, foram usadas cerca de cinquenta operárias em cada caixa baseando-se em trabalhos anteriores semelhantes (BAPTISTELLA, 2009). Entretanto, aparentemente isso não teve o mesmo efeito esperado para esta espécie, pois o número reduzido de operárias pode ter levado ao abandono das caixas, o que ocasionou a perda das rainhas.

Enquanto as abelhas estavam nas caixas foi observada a presença de duas rainhas na mesma caixa em duas situações, sendo que, nos dois casos, uma delas estava sendo atacada pelas operárias. Isso demonstra que a distância de um metro,

utilizada entre cada minicolônia, não foi adequada já que as rainhas saíram e retornaram para caixas trocadas, apesar da identificação das caixas por cores e desenhos diferentes.

O sistema de aquecimento elétrico utilizado nas caixas foi eficiente no controle da temperatura mínima, aquecendo as caixas quando atingiram o limite programado (28°C), mas não da máxima, que foi influenciada pela temperatura ambiente onde estava instalado, mesmo com proteção de isopor. Possivelmente, o excesso de calor (que chegou a 35 °C) também contribuiu para que a maioria das abelhas abandonasse as minicolônias e, assim, apenas uma das caixas permaneceu com operárias.

Como já mencionado nos resultados, esta caixa foi mantida com cerca de duzentas operárias e dois discos de cria com uma célula real. Após a emergência, a rainha foi marcada e acompanhada e, depois de vinte dias, provavelmente já fecundada, começou a comportar-se de maneira diferente passando a maior parte do tempo sobre as poucas células de cria construídas pelas operárias. Permaneceu assim durante uma semana, quando as primeiras células de cria com ovos foram observadas.

Esse intervalo de tempo entre a fecundação e o início de postura corrobora outra observação semelhante em *T. clavipes* (NOGUEIRA-FERREIRA e cols., 2009).

Entretanto, durante o período em que as duas rainhas ainda estavam virgens, não houve formação típica de agregação dos machos ao redor das caixas. Apenas na primeira minicolônia, durante a alimentação, foi observado um macho adulto parado dentro do ninho.

Não foi possível acompanhar o momento do acasalamento.

Em ambos os casos, o sistema de aquecimento das caixas funcionou efetivamente e permitiu o estabelecimento das abelhas, que responderam ao manejo conforme o esperado.

Na terceira tentativa para fundação de ninhos novos a partir de minicolônias, preparei as caixas antes da introdução das abelhas. A preparação envolveu o uso das colmeias matrizes, em que substituí suas tampas pelas caixas viradas para baixo, que depois de duas semanas foram usadas para formação das minicolônias. Nesse intervalo de tempo, as operárias dessas colmeias impregnaram a madeira com resina e esse fator pode ter contribuído para que as operárias introduzidas não abandonassem as caixas.

Nesse estágio, tentamos a captura de operárias em outros ninhos naturais espalhados pelo *campus* da universidade a fim de utilizá-las na formação das minicolônias, porém, essa estratégia não se mostrou eficaz, pois as abelhas responderam de forma agressiva durante a captura e acabaram morrendo dentro das caixas, grudadas umas às outras com a própria resina. Assim, voltei a utilizar discos de cria e operárias jovens.

Assim que as operárias estabeleceram-se dentro das caixas as rainhas foram introduzidas, em estágio de pupa pigmentada, dentro de cápsulas de cerume da própria minicolônia, posicionadas junto da área dos discos de cria. Após a emergência, permaneceram ativas e circulando dentro das minicolônias, entretanto desapareceram depois de três semanas.

A perda eventual das rainhas que não voltam para a minicolônia é um problema recorrente e esperado, conforme os trabalhos de BAPTISTELLA, 2009; MENEZES, 2010 e PRATO, 2011. Além disso, um dos grandes desafios é fazer com que as operárias aceitem as rainhas introduzidas.

O uso de cápsulas feitas com o cerume novo retirado das próprias minicolônias para envolver as rainhas, ainda em estágio de pupa, mostrou-se como melhor estratégia para aumentar a aceitação destas pelas operárias. Com isso, mesmo que existam operárias em idades diferentes dentro da minicolônia, a tendência é que as rainhas introduzidas não sejam atacadas, pois, no intervalo de tempo até a sua emergência, elas ainda não expressam os próprios feromônios cuticulares, o que evita a agressão por parte das operárias.

5.4 Morfometria geométrica de asas aplicada em *Tetragona clavipes*

A análise feita através da morfometria geométrica de asas, atualmente, mostra-se como uma ferramenta útil para caracterização e identificação de grupos de abelhas, auxiliando os trabalhos taxonômicos. Além disso, é uma técnica rápida e de baixo custo (SCHRODER e cols., 2002).

Funciona a partir da comparação entre deformações em estruturas homólogas, identificando variações sutis entre os indivíduos amostrados. No âmbito das abelhas sem ferrão é muito eficaz, se comparada com outras ferramentas usadas para a mesma finalidade e que não permitem as análises para os

meliponíneos devido à sua redução das veias da asa anterior, característica sinapomórfica das abelhas desse grupo (FRANCOY e cols., 2010).

Quando usada em indivíduos da mesma espécie, essa técnica oferece aplicação dentro de várias abordagens, mas principalmente mostrando se há ou não divergências evolutivas entre os grupos, podendo ser aliada a técnicas moleculares e, assim, corroborar ou não estudos relacionados à distribuição biogeográfica das populações.

BONATTI (2012) analisou populações de *Melipona subnitida*, que tem ocorrência ampla no bioma da Caatinga, e observou uma separação em certos grupos, que provavelmente representam ecótipos adaptados localmente. Porém, quando os dados foram cruzados com análises moleculares, usando marcadores de regiões do DNA mitocondrial, não encontrou similaridade nos padrões de distribuição para algumas localidades. A sugestão para isso foi de que a ação antrópica poderia estar influenciando o fluxo gênico entre as populações desta abelha em certas localidades, já que a espécie é muito requisitada entre meliponicultores.

Em outro estudo, FRANCOY e cols. (2009) compararam caracteres entre machos e operárias de cinco espécies de meliponíneos e obtiveram resultados que mostraram a maior proximidade entre os indivíduos coespecíficos e de sexos opostos, do que quando comparados com indivíduos do mesmo sexo de outra espécie. Assim, os grupos ficaram separados e foi possível demonstrar que, para resolver questões taxonômicas, tanto indivíduos machos como fêmeas de uma mesma espécie servem para identificação correta dos grupos, uma vez que o teste de validação cruzada apontou erros apenas na comparação entre indivíduos dos sexos opostos, porém, da mesma espécie e não entre espécies.

Uma abordagem ainda não explorada é a comparação entre asas das castas dos meliponíneos, sendo interessante verificar e caracterizar a existência de possíveis diferenças no padrão das nervuras, uma vez que os indivíduos, embora sejam do mesmo sexo, possuem adaptações morfológicas e funcionais únicas.

Inicialmente, a proposta apresentada aqui foi para caracterização das asas entre as abelhas que se alimentaram com a quantidade de alimento larval limiar para a diferenciação de castas, para averiguar se nesta situação as castas são bem definidas.

A análise feita entre as asas das rainhas e operárias, obtidas em laboratório, e outro grupo de operárias naturais revelou a existência de diferenças no padrão da

venação entre as castas de *T. clavipes*, conforme abordado na seção dos resultados.

Os grupos ficaram separados conforme a gradação do volume de alimento larval fornecido às larvas.

Uma rainha obtida com 45 μ L ficou agrupada com as rainhas de 50 μ L e uma operária obtida com 50 μ L foi incluída no grupo das operárias maiores, obtidas com 40 μ L de alimento larval. Apesar do número pequeno nessa amostragem, isso sugere que, independentemente do volume de alimento larval consumido, as castas apresentam características bem definidas em relação à formação das veias na asa.

Além da análise baseada nos marcos anatômicos, as fotomicrografias (figura 33) evidenciaram a existência de uma ramificação de uma das veias nas asas das rainhas, que não se encontra desenvolvida nas asas das operárias naturais, bem como a formação gradual desse segmento de veia conforme as larvas se alimentaram mais. Quanto a isso, operárias e rainhas obtidas com a quantidade limiar apresentaram vestígios do início da formação da veia.

A cascata de expressão gênica que controla a formação dos discos imaginais das asas é bem conhecida em estudos com a mosca *Drosophila melanogaster*, além de outros trabalhos feitos com espécies de borboletas e formigas, que sugerem que esse mecanismo seja conservado em grande parte dos grupos de insetos holometábolos.

ABOUHEIF e WRAY (2002) analisaram a expressão gênica diferencial de seis genes (que regulam o desenvolvimento das asas em *D. melanogaster*) entre castas de quatro espécies de formigas, identificando o momento do desenvolvimento em que ocorre a interrupção da formação dos discos imaginais das castas não aladas. Em *Pheidole morrisi*, foi demonstrado que as fêmeas soldado possuem discos imaginais vestigiais da asa anterior e que a interrupção da expressão de um único gene (*spalt*) durante o último instar larval, responsável pelo posicionamento das veias da asa, faz com que os discos imaginais não se diferenciem e o processo seja interrompido. Nas formigas, a diferenciação das castas e essa regulação são exercidas pelos estímulos ambientais (fotoperíodo) e também por fatores alimentares durante o desenvolvimento das larvas.

O aparecimento de uma veia nas asas das rainhas de *T. clavipes*, que não se encontra nas asas das operárias naturais, sugere a influência hormonal derivada da superalimentação da larva. Podemos inferir que, as larvas que se alimentam mais possuem maior quantidade de hormônio juvenil durante a fase de metamorfose, que

é o período em que os discos imaginais se diferenciam e formam os apêndices do inseto. Assim, a disponibilidade maior de alimento consequentemente poderia aumentar os títulos de hormônio durante o crescimento das veias da asa e, de forma gradual, reflete na formação dessa estrutura.

Funcionalmente, a presença desse ramo de veia poderia conferir algum benefício estrutural para o voo das rainhas que, apesar de possuírem asas com tamanhos semelhantes ao das operárias, são mais pesadas.

Para confirmar os resultados satisfatoriamente, é necessário mais testes com o aumento da amostragem e repetições desse experimento, além da análise de asas das rainhas naturais.

5.5 Presença de fungos no alimento larval

O fungo encontrado nas células de cria de *T. clavipes* é de um tipo específico, aparentemente selecionado por esse microambiente. Suas hifas têm sempre o mesmo aspecto, muito finas e de cor branca; surgem em uma fase específica do desenvolvimento das larvas e de forma pontual entre os discos de cria. Geralmente no terceiro e quarto disco de cria, contados partir das células novas, encontramos suas hifas crescendo na parede das bordas das células e com pouco contato direto com o alimento larval.

O fungo necessita de uma superfície estável para seu desenvolvimento e o meio líquido do alimento larval é desfavorável para sua fixação, uma vez que a larva se alimenta em constante movimento circular e assim o faz até a fase em que tece o casulo de seda. Após a larva defecar não encontramos mais vestígios da presença do fungo.

Em uma ocasião após a diminuição da umidade relativa, formou-se uma película sobre o alimento larval de um dos poços onde a larva havia morrido e, nesta única condição, desenvolveu-se um tipo de fungo com hifas semelhantes ao fungo encontrado nas células de cria naturais.

Talvez os esporos do fungo estejam presentes no cerume usado pelas operárias durante a construção dos favos de cria e, quando estão sob a influência da umidade e pH do alimento larval, à medida em que estes se alteram no decorrer do desenvolvimento da larva, encontram um local propício ao seu desenvolvimento e assim observamos suas hifas, crescendo a partir do cerume.

A presença de microrganismos variados no interior dos ninhos de meliponíneos já foi constatada e citada na literatura. Especificamente para *T. clavipes*, SANTOS (2007) analisou amostras dos produtos das colmeias desta espécie e encontrou uma contaminação por agentes patógenos na cera e na própolis. No entanto, a análise ficou restrita à presença de bactérias do gênero *Bacillus*, sem aprofundar-se na identificação de fungos e/ou leveduras.

Trabalhos semelhantes com outras espécies de meliponíneos sugerem que exista uma associação entre diversos microrganismos que estão presentes no alimento larval, provavelmente, auxiliando na degradação de componentes como proteínas e lipídeos, que são ingeridos pela larva e que cada espécie de abelha tenha uma flora microbiana específica.

Até o momento, a ocorrência de um fungo nas mesmas condições encontra-se relatada na literatura para a espécie de abelha *Scaptotrigona aff. depilis* (MENEZES, 2010), ainda sem uma descrição da relação exata existente entre o fungo e essas abelhas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento das abelhas sem ferrão, considerando que, somente no Brasil, encontramos mais de trezentas espécies e pouco sabemos sobre poucas espécies. Como foi colocado no texto, *Tetragona clavipes* é uma delas e que possui um grande potencial no manejo para produção de mel, própolis e na polinização, visto que armazena uma grande quantidade de pólen dentro do ninho, o que sugere que é uma espécie que visita um leque grande de espécies vegetais com coleta eficiente de pólen (anexo I).

A aquisição e reunião de informações importantes sobre a biologia e comportamento de *T. clavipes*, mostrando peculiaridades e limitações referentes ao seu manejo na criação racional de abelhas sem ferrão, até então desconhecidas, indica qual direção seguir no estudo desta espécie como, por exemplo, quais espécies vegetais são polinizadas efetivamente por esta abelha; qual a capacidade produtiva desta espécie; qual a taxa de fecundidade das rainhas obtidas artificialmente; como é o acasalamento nesta espécie e o que pode contribuir para o estabelecimento das minicolônias.

Foram sugeridos tópicos importantes que merecem um esforço maior para a compreensão mais efetiva acerca da técnica de multiplicação de colônias através das rainhas produzidas artificialmente, tais como: se a utilização de rainhas menores para fundação de colmeias é viável, uma vez que pode acelerar o processo. Também foi testada uma alternativa eficiente para introdução das rainhas, ainda em fase de pupa, em minicolônias estabelecidas previamente apenas com as operárias, não importando a idade destas.

Apesar do número pequeno de ninhos conseguidos através da formação de minicolônias, todos os que foram estabelecidos em caixas padronizadas para criação racional encontram-se disponíveis para pesquisas futuras, mostrando a viabilidade do manejo de *T. clavipes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUHEIF, E.; WRAY, G. A. (2002). **Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants**. Science. v. 297. p. 249-252.
- ALMEIDA-ANACLETO, D. (2007). **Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, São Paulo**. Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em Ciências, área Entomologia. ESALQ, Universidade de São Paulo. 133 p.
- ALVES, D. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SANTOS-FILHO, P. S. (2009). **Production of workers, queens and males in *Plebeia remota* colonies (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), a stingless bee with reproductive diapauses**. Genetics and Molecular Research. v. 8. p. 672-683.
- ALVES, D. A.; WENSELEERS, T.; FRANCOY, T. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NOGUEIRA-NETO, P.; SANTOS-FILHO, P. S. (2008). **Conflito entre rainha e operárias na produção de machos em colônias de *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini)**. Anais do VIII Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto. São Paulo. p. 245-246.
- BAPTISTELLA, A. R. T. O. (2009). **Produção “in vitro” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia* (Apidae, Meliponina)**. Dissertação de Mestrado (Entomologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 70 p.
- BONATTI, V. (2012). **Caracterização genético-morfológica de populações de *Melipona subnitida* (Apidae, Meliponini) no nordeste brasileiro**. Dissertação de Mestrado (Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 96 p.
- BONETTI, A. M.; KERR, W. E. (1984). **Estudo da ação gênica em *Melipona marginata* e *Melipona compressipes* a partir de análise morfométrica**. Revista Brasileira de Genética. v. 8. p. 629 - 638.

- BOURKE, A. F. G.; RATNIEKS, F. L. W. (1999). **Kin conflict over caste determination in social Hymenoptera**. Behavioral Ecology and Sociobiology. v. 46. p. 287-297.
- CABRAL, G. C. P. (2009). **Efeitos da quantidade de alimento larval sobre a determinação de castas da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) – uma análise morfométrica, de expressão gênica e de títulos de hormônio juvenil**. Dissertação de Mestrado (Entomologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 83 p.
- CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. (2008). In Moure, J. S.; Urban, D.; Melo, G. A. R. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Versão online disponível em <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue?id=12912>> Acessado em 01/Mar/2012.
- CARANTÓN, O. A. M.; FREITAS, G. S.; SOARES, A. E. E. (2010). **Produção de rainhas e melhoramento genético em *Apis mellifera***. São Francisco Gráfica e Editora. Ribeirão Preto – São Paulo. 55 p.
- CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; DIAS, C. S.; ALVES, R. M. O.; MELO, A. F. L.; SOARES, A. C. F.; CARVALHO-ZILSE, G. A. (2011). **Five egg-laying queens in a single colony of brazilian stingless bees (*Melipona scutellaris* Latreille)**. Acta Amazonica. v. 41. p. 123-126.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I. B.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. (2006). **Global meliponiculture: challenges and opportunities**. EDP Sciences. Apidologie n. 37. p. 275-292.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. (2007). **O que nos informam as agregações de machos em meliponini?** Bioscience Journal. Uberlândia. v. 23. s. 1. p. 153-160.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. (1991). **Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de méliponinés du Brésil**. Apidologie. v. 22. p. 61-73.

- COSTA, L.; VENTURIERI, G. C.(2007). **Caixas incubadoras para a formação e observação de colônias de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponinae)**. Bioscience Journal. Uberlândia. v. 23. s.1. p. 141-146.
- ENGEL, M. S. (2000). **A new interpretation of the oldest fossil bee (Hymenoptera: Apidae)**. American Museum Novitates. Museu Americano de História Natural. Nova Iorque. n. 3296. 11 p.
- FRANCOY, T. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (2010). **A morfometria geométrica de asas e a identificação automática de espécies de abelhas**. Oecologia Australis. v. 14. p. 317-321.
- FRANCOY, T. M.; SILVA, R. A. O.; NUNES-SILVA, P.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (2009). **Gender identification of five genera of stingless bees (Apidae, Meliponini) based on wing morphology**. Genetics and Molecular Research. v. 8. p. 207-214.
- FREITAS, G. S.; SOARES, A. E. E. (2004). **Procurando irá**. Um passeio ecológico. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 35 p.
- FREITAS, G. S.; ASSIS, A. F.; SOUZA, C. C. M.; SOUSA, J.; SOARES, A. E. E. (2009). **O doce lar das abelhas indígenas sem ferrão**. Mensagem doce. APACAME - Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíficas Européias. n. 100. p. 15-20.
- GILLIAM, M.; BUCHMANN, S. L.; LORENZ, B. J.; ROUBIK, D. W. (1985). **Microbiology of the larval provisions of the stingless bee, *Trigona hypogaea*, an obligate necrophage**. Biotropica. v. 17. n. 1. p. 28-31.
- GRÜTER, C.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; RATNIEKS, F. L. W. (2012). **A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee**. PNAS. v. 109. p. 1182-1186.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, L. (2007). **A iniciativa brasileira de polinizadores e os avanços para a compreensão do papel dos polinizadores como produtores de serviços ambientais**. Bioscience Journal. Uberlândia. v. 23. s. 1. p. 100-106.

- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NOGUEIRA NETO, P.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; SILVA, P. N.; GIANNINI, T. C. **Guia ilustrado das abelhas sem ferrão do estado de São Paulo**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Versão online disponível em <http://www.ib.usp.br/beesp/tetragona_clavipes_veg.htm>
- KAMAKURA, M. (2011). **Royalactin induces queen differentiation in honeybees**. Nature. V. 473. p. 478-483.
- KARASAWA, M. M. G. (2009). **Diversidade reprodutiva de plantas**. Sociedade Brasileira de Genética . Ribeirão Preto - São Paulo. 113 p.
- KERR, W. E. (1997). **Sex determination in honey bees (Apinae and Meliponinae) and its consequences**. Brazilian Journal of Genetics. Ribeirão Preto. v. 20. n. 4. 16 p.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. e NASCIMENTO, V. A. (1996). **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Ed. Fundação Acangau, Paracatu - MG. 144 p.
- LACERDA, L. M.; SIMÕES, Z. L. P. (2006). **Ovos produzidos por rainhas e operárias de *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina): morfometria e aspectos relacionados**. Iheringia, Série Zoologia. Porto Alegre. n. 96. v. 1. p. 89-93.
- MALAGODI-BRAGA, K. S. (2002). **Estudo de agentes polinizadores em cultura de morango**. Tese apresentada para obtenção de título de Doutor em Ciências, área Ecologia. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Ecologia. São Paulo. 104 p.
- MATEUS, S.; PEREIRA, U. C. R.; CABETTE, H. S. R.; ZUCCHI, R. (2009). **Locais de nidificação das abelhas nativas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) do parque Municipal do Bacaba, Nova Xavantina - MT**. Mensagem doce. APACAME. Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíferas Européias. n. 100. p. 60-62.
- MAUÉS, M. M. (2002). Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. in:

- KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília. p.245-254.
- MENEZES, C. (2010). **A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. 97 p.
- MENEZES, C.; BONETTI, A. M.; AMARAL, I. M. R.; KERR, W. E. (2007). **Alimentação larval de *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): estudo individual das células de cria**. Bioscience Journal. Uberlândia. v. 23. s. 1. p. 70-75.
- MICHENER, C. D. (2007). **The bees of the world**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press. ed. 2. 953 p.
- NOGUEIRA-FERREIRA, F. H.; SILVA-MATOS, E. V.; ZUCCHI, R. (2009). **Interaction and behavior of virgin and physogastric queens in three *Meliponini* species (Hymenoptera, Apidae)**. Genetics and Molecular Research. v. 8. p. 703-708.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1997). **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis. 446 p.
- OLIVEIRA, R. C. (2009). **Ninhos-armadilha para abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. 50 p.
- PEDRO, S. R. M.; CAMARGO, J. M. F. (1999). Apoidea Apiformes. In: BRANDÃO, C. R. F.; CANCELLO, E. M. **Biodiversidade do Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX**. ed. 1. São Paulo. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. v. 5. p. 193-211.
- PRATO, M. (2011). **Ocorrência natural de sexuais, produção in vitro de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca augustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de

- Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 114 p.
- PETERS, J. M.; QUELLER, D. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; STRASSMANN, J. E. (1999). **Mate number, kin selection and social conflicts in stingless bees and honeybees**. Proc. R. Soc. Lond. B. The Royal Society. p. 379-384.
- RATNIEKS, F. L. W. (2001). **Heirs and spares: caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees**. Behavioral Ecology and Sociobiology. v. 50. p. 467-473.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (2007). **Biologia vegetal**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Ed. 7. 856 p.
- ROCHA, M. P.; POMPOLO, S. G.; CAMPOS, L. A. O. 2003. Citogenética da tribo Meliponini. in **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure**. Editora UNESC, Criciúma, 2003. p 311-320.
- RODRIGUES, A. S. (2005). **Etnoconhecimento sobre abelhas sem ferrão: saberes e práticas dos índios guarani M'byá na Mata Atlântica**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ecologia de Agroecossistemas. Piracicaba. ESALQ, Universidade de São Paulo. 253 p.
- RODRIGUES, M.; SANTANA, W. C.; FREITAS, G. S.; SOARES, A. E. E. (2007). **Atividade de voo de *Tetragona clavipes* (FABRICIUS, 1804) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) no campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, SP**. Bioscience Journal. Uberlândia. v. 23. s. 1. p. 118-124.
- SÁ, N. P.; PRATO, M. (2007). **Conhecendo as abelhas: um projeto de ensino**. Bioscience Journal. Uberlândia. v. 23. s. 1. p.107-110.
- SAKAGAMI, SHOICHI F. (1967). **Behavior studies of the stingless bees, with special reference to the oviposition process. V I. *Trigona* (*Tetragona*) *clavipes***. Journ. Fac. of Science. Hokkaido University. VI Zool. v. 16 n. 2 p. 292-313.

- SANTOS, A. L. (2007). **Identificação da flora microbiana em colmeias de Meliponina**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica, área Genética. Universidade Federal de Uberlândia. 46 p.
- SCHRODER, S.; WITTMANN, D.; DRESCHER, W.; ROTH, V.; STEINHAGE, V.; CREMERS, A. B. (2002). The new key to bees: automated identification by image analysis of wings. in: Kevan, P.; Imperatriz Fonseca, V. L. **Pollinating bees - the conservation link between agriculture and nature**. Ministry of Environment. Brasília. p.209-216.
- SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M. (1997). **Morphological and biochemical analysis of the stored and larval food of an obligate necrophagous bee, *Trigona hypogea***. Insectes Sociaux. v. 44. p. 337-344.
- SFORCIN, J. M. (2009). **Própolis e imunidade: comprovações científicas**. Editora Unesp. São Paulo. 67 p.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. (2002). **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Fundação Araucária. Belo Horizonte. 253 p.
- SLAA, E. J.; SÁNCHEZ-CHAVES, L. A.; MALAGODI-BRAGA, K.S.; HOFSTEDE, F. E. (2006). **Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives**. EDP Sciences Apidologie n. 37. p. 293-315.
- TÓTH, E.; *et al.* (2002). **Male production in stingless bees: variable outcomes of queen-worker conflict**. Blackwell Science Ltd. Molecular Ecology. v. 11. p. 2661-2667.
- VAMOSI, J. C.; *et al.* (2006). **Pollination decays in biodiversity hotspots**. PNAS v. 103. n. 4. p. 956–961.
- VELTHUIS, H. H. W. (2002). The historical background of the domestication of the bumble-bee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture. in: KEVAN, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília. p. 177-184.
- WINSTON, P.W.; BATES, D.H. (1960). **Saturated solutions for the control of humidity in biological research**. Ecology. v. 41. p. 232-237.

- WINTER, K.; ADAMS, L.; THORP, R.; INOUE, D.; DAY, L.; ASCHER, J.; BUCHMANN, S. (2006). **Importation of non-native bumble bees into North America**: potential consequences of using *Bombus terrestris* and other non-native bumble bees for greenhouse crop pollination in Canada, Mexico, and the United States. A White Paper of the North American Pollinator Protection Campaign (NAPPC). 35 p.
- WITTER, S.; BLOCHTEIN, B. (2003). **Efeito da polinização por abelhas e outros insetos na produção de sementes de cebola**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília. v. 38. n. 12. p. 1399-1407

ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 Lista de espécies de plantas usadas por *Tetragona clavipes* para forrageamento

<i>Allamanda carthartica</i>	<i>Eremanthus sphaerocephalus</i>	<i>Psidium incanescens</i>
<i>Anadenanthera falcata</i>	<i>Eriotheca gracilipes</i>	<i>Plumbago capensis</i>
<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>	<i>Erycinium junceum</i>	<i>Pyrostegia venusta</i>
<i>Aspilia reflexa</i>	<i>Erythroxylum nitidum</i>	
<i>Asystasia gangetica</i>	<i>Eupatorium maximilianii</i>	<i>Qualea parviflora</i>
<i>Axonopus barbigerus</i>	<i>Eupatorium squalidum</i>	
	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	<i>Rinchelytrum roseum</i>
<i>Baccharis dracunculifolia</i>		
<i>Banisteriopsis laevifolia</i>	<i>Gochnatia barrosii</i>	<i>Sapium glandulatum</i>
<i>Banisteriopsis pubipetala</i>	<i>Grevillea banksii</i>	<i>Scleria bracteata</i>
<i>Bauhinia rufa</i>	<i>Gymnopogon foliosus</i>	<i>Senna macranthera</i>
<i>Bauhinia variegata</i>		<i>Serjania lethalis</i>
<i>Bidens gardnerii</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Solanum cf paniculatum</i>
<i>Bidens segetum</i>	<i>Heteropteris byrsonimifolia</i>	<i>Solanum lycocarpum</i>
<i>Bixa orellana</i>	<i>Hyptis rugosa</i>	<i>Stillpnopappus speciosus</i>
<i>Butia leiospatha</i>		<i>Stryphnodendron polyphyllum</i>
<i>Byrsonima crassa</i>	<i>Ligustrum cf. lucidum</i>	<i>Styrax camporum</i>
<i>Byrsonima intermédia</i>	<i>Lithraea molleoides</i>	
		<i>Tecoma stans</i>
<i>Caesalpinia pelthophoroides</i>	<i>Mascagnia cordifolia</i>	<i>Thevetia peruviana</i>
<i>Cajanus cajan</i>	<i>Melia azedarach</i>	<i>Thunbergia grandiflora</i>
<i>Caryocar brasiliense</i>	<i>Mikania cordifolia</i>	<i>Trema micrantha</i>
<i>Chamaecrista nictitans</i>	<i>Myrcia aff. uberavensis</i>	<i>Trichogonia salviaefolia</i>
<i>Chorisia speciosa</i>	<i>Myrcia hella</i>	<i>Triumfetta bantramia</i>
<i>Cosmos cf. caudatus</i>	<i>Myrcia língua</i>	<i>Turnera cf. ulmifolia</i>
<i>Couepia grandiflora</i>		
<i>Croton glandulosus</i>	<i>Orthopeppus angustifolius</i>	<i>Vernonia brasiliiana</i>
<i>Croton macrobothrys</i>	<i>Ouratea spectabilis</i>	<i>Vernonia diffusa</i>
<i>Cupania oblongifolia</i>	<i>Oxalis physocallyx</i>	<i>Vernonia ferruginea</i>
<i>Delonix regia</i>		<i>Vernonia petiolaris</i>
<i>Dendropanax cuneatum</i>	<i>Pachira cf. aquática</i>	<i>Vernonia polyanthes</i>
<i>Desmodium pachyrrhizum</i>	<i>Parthenium hysterophorus</i>	<i>Vernonia rubriramea</i>
<i>Didymopanax vinosum</i>	<i>Paspalum notatum</i>	<i>Vernonia ruficoma</i>

<i>Diplusodon virgatus</i>	<i>Paspalum plicatulum</i>	<i>Vochysia rufa</i>
<i>Dracaena fragrans</i>	<i>Pentas lanceolata</i>	
<i>Duranta repens</i>	<i>Periandra mediterrânea</i>	<i>Waltheria cf. communis</i>
	<i>Piper gaudichaudianum</i>	<i>Waltheria indica</i>
<i>Echinolaena inflexa</i>	<i>Piptocarpha axillaris</i>	<i>Wulffia stenoglossa</i>

Referências

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NOGUEIRA NETO, P.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; SILVA, P. N.; GIANNINI, T. C. **Guia ilustrado das abelhas sem ferrão do estado de São Paulo**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Versão online disponível em <http://www.ib.usp.br/beesp/tetragona_clavipes_veg.htm>

MATEUS, S. 1998. Abundância relativa, fenologia e visita as flores pelos Apoidea do cerrado da Estação Ecológica de Jataí - Luiz Antônio - SP. MSC Thesis. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 159p.

SOFIA, S.H. 1996. As abelhas e suas visitas as flores em 2 áreas urbanas. PHD Thesis. UNESP. Rio Claro, São Paulo, SP.

RAMALHO, M. 1995. Diversidade de Abelhas (APOIDEA - HYMENOPTERA) em um Remanescente de Floresta Atlântica, em São Paulo. PHD Thesis. Universidade de São Paulo.

PEDRO, S. R. M. 1992. Sobre as abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em um ecossistema de cerrado (Cajuru, NE do estado de São Paulo): composição, fenologia e visita às flores. MSC Thesis. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 200 p.

SILVEIRA, F.A. 1989. Abelhas silvestres (Hymenoptera-Apoidea) e suas fontes de alimento no cerrado da Estação Florestal de Experimentação de Paraopeba - Minas Gerais. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 50p.

8.2 Lista de espécies de plantas utilizadas por *Tetragona clavipes* para nidificação

<i>Caesalpinia peltophoroides</i> ,
<i>Caesalpinia sp.</i> ,
<i>Eucalyptus grandis</i> ,
<i>Jacaranda sp.</i> ,
<i>Juglans sp.</i> ,
<i>Persea americana</i> ,
<i>Piptadenia sp.</i> ,
<i>Pterogyne nitens</i> ,
<i>Salvertia convallariodora</i> .

Referências

- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NOGUEIRA NETO, P.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; SILVA, P. N.; GIANNINI, T. C. **Guia ilustrado das abelhas sem ferrão do estado de São Paulo**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Versão online disponível em <http://www.ib.usp.br/beesp/tetragona_clavipes_veg.htm>
- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.R.M. 2004. Meliponini neotropicais: o gênero *Ptilotrigona* Moure (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 48(3): 353-377.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; RIBEIRO, M.F.; NOGUEIRA-NETO, P. & ROSSO, J.M. 2002. Nidificação de abelhas sem ferrão em um Cerrado de Goiás. In: *Anais do V Encontro sobre Abelhas*: 303.
- FREITAS, G.S. 2001. Levantamento de ninhos de meliponíneos (Hymenoptera, Apidae) em área urbana: Campus da USP, Ribeirão Preto/SP. Dissertação: Universidade de São Paulo.
- PINHEIRO-MACHADO, C. A., KLEINERT, A.M.P. 1993. Abundância relativa e distribuição de ninhos de meliponíneos (Apidae, Meliponinae) numa área urbana (23°33'S; 46°43'W): dados preliminares. *Ciência e Cultura*