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

Sobre a produção e seleção de rainhas em diferentes fases do ciclo colonial em
Epiponini (Vespidae: Polistinae).

Laura Elena Chavarría Pizarro
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Noll

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

RIBEIRÃO PRETO-SP

2013

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.

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo

Chavarría, Laura Elena Pizarro

Sobre a produção e seleção de rainhas em diferentes fases do ciclo colonial em
Epiponini (Vespidae: Polistinae), 2013.

124 p. : il. ; 30cm

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/
USP. Área de Concentração: Entomologia.

Orientador: Noll, Fernando Barbosa.

1. Vespas sociais 2. Rainhas 3. Operárias 4. Comportamento 5. Seleção

Nome: Chavarría, Laura Elena Pizarro

Título: Sobre a produção e seleção de rainhas em diferentes fases do ciclo colonial em
Epiponini (Vespidae: Polistinae).

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área:
Entomologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Ao meu querido anjo, companheiro,
amigo e cachorro Athos. Obrigada por
compartilhar tua vida comigo e por
mostrar para mim que ainda tem seres que
podem amar sem condições.
Athos, eres eterno porque teu amor
sublime e puro sempre viverá comigo.*

Agradecimentos

A minha família, principalmente minha irmã Tania que durante meu doutorado foi um exemplo de força e perseverança, obrigada pela assistência de campo oferecida na Costa Rica; você também é minha pessoa preferida. Minha mãe Roxana pelo apoio, pelos contatos com o MINAE da Costa Rica, e pelo carinho desde a distancia. Meu pai Héctor pelo apoio incondicional, obrigada por ajudar-me a acreditar que aquela fábrica dos sonhos ainda existe.

Ao meu orientador Fernando Barbosa Noll, muito obrigado pela oportunidade de trabalhar com você, pela ajuda e disponibilidade, por saber escutar, pela amizade e confiança. Se professor é aquele que ensina mas mestre é aquele com quem você aprende, você é mestre. Aprendi muito de você nestes anos, tomara que a gente possa trabalhar junto de novo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq) pela bolsa concedida durante o primeiro semestre do doutorado. À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela bolsa concedida (2009/07526-2), indispensável para a realização do meu doutorado.

Ao Sérgio, nunca pensei que a primeira pessoa que conheci no Brasil seria tão importante na minha vida. Meu companheiro, obrigada por estar comigo toda vez que precisei, pelo amor e compreensão. Obrigada pela assistência durante a realização do trabalho de campo, pela ajuda no trabalho de laboratório, e pelas sugestões na análise e discussão dos dados.

A Fabi e o Luciano obrigada por oferecer sua casa e ajuda desinteressada todas as vezes que precisei. Fabi obrigada pela companhia em muitas das viagens para Pedregulho, pela amizade e apoio emocional oferecido durante estes anos. Luciano obrigada pela assistência de campo em Pedregulho.

Ao Getúlio Tanaka por toda a ajuda oferecida para a realização das observações de campo em Fronteira (MG). Ao Sidnei Mateus pela disponibilidade, ajuda e contatos para a realização das observações em Pedregulho. Ao Fábio Nascimento, Carlos Alberto dos Santo e Sidnei Mateus pelas informações oferecidas para realizar a análise filogenética. Ao Amauri e a Edineia pela ajuda oferecida para realizar observações em sua propriedade na Furna São Pedro em Pedregulho (SP). Ao pessoal do Refugio de Vida Silvestre Golfito e Parque Nacional Piedras Blancas na Costa Rica, principalmente aos guarda parques pela ajuda desinteressada e companhia que me ofereceram, e pelas muitas assistências no campo. Muito grata com vocês por cuidar do maior tesouro do nosso país. Ao Rodrigo Santinelo Pereira por disponibilizar seu laboratório todas as vezes que precisei. Ao Luiz Fernando Gelin pela ajuda na identificação das vespas. A Simony e a Cíntia obrigada pela amizade, ajuda e por oferecer suas casas sempre que precisei nas visitas a Rio Preto.

Resumo

As vespas da tribo Epiponini apresentam colônias com várias rainhas, cujo número varia durante o ciclo colonial. Nas colônias há inicialmente um número maior de rainhas, mas conforme o ciclo se desenvolve seu número diminui. Tem sido argumentado que nas colônias com indivíduos totipotentes pode haver conflitos de interesse entre rainhas e operárias. Neste contexto as operárias que são maioria poderiam ter uma vantagem para regular a produção de rainhas. Nos Epiponini o controle reprodutivo é feito possivelmente por sinalização química, que junto com posturas ritualizadas comunicam a presença da rainha na colônia. Como o processo de produção de rainhas é pouco conhecido, o objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento de rainhas e operárias durante a fase de produção e seleção de modo a interpretar filogeneticamente as mudanças comportamentais entre as espécies. O estudo foi conduzido utilizando-se nove espécies de cinco gêneros: *Chartergellus*, *Metapolybia*, *Protopolybia*, *Polybia*, *Brachygastra*. Em cada colônia foram marcadas todas as rainhas, algumas operárias, e fêmeas recém-emergidas para realizar observações focais e filmagens dos comportamentos. Para promover a produção de rainhas foram feitos testes de remoção. Alguns dos comportamentos característicos das rainhas, e aqueles associados ao processo de seleção, tiveram sua origem interpretada filogeneticamente. O comportamento que melhor identifica as rainhas é o *bending display* I (BD1), um *display* de dominância feito das rainhas para as operárias, que foi basal para os Epiponini. O BD1 feito das operárias para as rainhas é uma apomorfia das operárias de *Metapolybia*. Outros comportamentos de teste entre rainhas surgiram independentemente em algumas espécies e poderiam estar relacionados com um aumento na complexidade das interações. Os testes das operárias estariam presentes no ancestral dos Epiponini indicando que elas controlam a seleção das rainhas. O comportamento de *worker dance* é utilizado principalmente pelas operárias dos clados de *Polybia* e *Metapolybia* para testar a capacidade reprodutiva das rainhas. Parece que os comportamentos ritualizados de dominância e de teste são utilizados como sinais honestos do potencial reprodutivo das fêmeas em vez de comportamentos agressivos. Em *Metapolybia* e *Protopolybia exigua* o BD1 é realizado com maior frequência após a eliminação da rainha e durante a seleção, diferente de *Chartergellus* e *Protopolybia picteti* onde não houve mudança. Em *Chartergellus* não houve um aumento dos *displays*, porque as fêmeas no geral não interagem e a seleção é feita mediante a expulsão das rainhas. Em *P. picteti* nem todas as rainhas foram eliminadas. Em *Metapolybia* e *Chartergellus* no início do ciclo colonial há tolerância reprodutiva, e a eliminação das rainhas estimulou muitas fêmeas a ovipositar, mas o número eventualmente diminui. Este resultado mostra que a delimitação de casta poderia ser feita mediante algum tipo de sinalização química. Em *Protopolybia* há pouca redução do número de rainhas ao longo do ciclo e as intermediárias constantemente tentam botar ovos. Para as intermediárias é conveniente manter os ovários ativos para tentar atingir o status de rainha em uma nova colônia. A totipotência das fêmeas para desenvolver seus ovários é basal para os Epiponini. As operárias e intermediárias jovens, de idade intermediária e velhas podem desenvolver seus ovários diante da ausência da rainha. A flexibilidade é um traço muito importante nos Epiponini, uma vez que permite à população responder a situações adversas, mobilizando indivíduos a realizar diferentes tarefas segundo as necessidades da população.

Abstract

Epiponini wasps have colonies with multiple queens, which alternate their number under different stages of the colony cycle. Initially there are several potential queens, but as the colony cycle develops, queen number is reduced. Because most of individuals remain reproductively totipotent there is great potential for conflicts over reproduction. Under this conditions workers could have an advantage to control queen production because they are the dominant caste. Reproductive control could be performed by chemical signals, which along with ritualized behaviors communicate queen presence in the colony. However, queen selection process is a little known across Epiponini, and for this reason our goal was to study queen's and worker's behavior during queen selection phase, performing a phylogenetic analysis to understand behavioral changes among species. We performed observations in nine species belong to five genera: *Chartergellus*, *Metapolybia*, *Protopolybia*, *Polybia*, *Brachygastra*. We marked queens, a sample of workers and newly emerged females to perform direct and video focal observations. To induce queen production, we performed queen removal tests. Some of queen's characteristic behaviors and those associated with queen selection process were analyzed via phylogenetic optimization. *Bending display I* (BD1) is a dominance *display* performed queens against workers, is the behavior that better identify queens and is also basal for all Epiponini clades. *BD1* perform from workers to queens is an apomorphy of *Metapolybia*. Another test behaviors performed among queens appeared independently in some species, and could be related with an increase of interaction complexity. Worker tests were present in the Epiponini ancestor, indicating that workers are in charge of queen control. *Worker dance* behavior was synapomorphic for the clade composed by *Polybia*, *Metapolybia* and their close related genera, in which workers test queen's reproductive potential. Apparently, ritualized tests and dominance behaviors are used in Epiponini as "honest signals" of queen's reproductive potential instead of aggressive behaviors. In *Metapolybia* and in *Protopolybia exigua*, *BD1* is performed with high frequency after queen elimination and during queen selection process. On the other hand, in *Chartergellus* and *Protopolybia picteti* *displays* frequency did not change. In *Chartergellus* *BD1* frequency did not change because females do not interact to each other a lot, also queen selection is performed by queen's expulsion instead by tests. In *P. picteti* we possibly failed to remove all queens from the colony. *Metapolybia* and *Chartergellus* have reproductive tolerance between females during first stages of colony cycle, and queen elimination induced females to lay eggs, but queen number eventually is reduced. These results suggest that reproductive control in fact could be performed by chemical signals. On the other hand, in *Protopolybia* queen's number change little during the colony cycle. In addition, intermediates constantly attempt to lay eggs. Persistence oviposition could be convenient for intermediates in *Protopolybia* to achieve queen status in new colonies. Female's totipotency to develop ovaries is also basal for Epiponini. Not only young females develop their ovaries under queen lost; old and middle age individuals also attempt to replace the queen. Caste flexibility is decisive for colony survival of swarm wasps because allows colonies to respond efficiently to different situations that may eventually arise.

Índice

Introdução	01
Objetivos.....	07
Materiais e Métodos.....	08
Descrição das espécies.....	08
Localidades de estudo.....	11
Análises comportamentais.....	18
Otimização filogenética de caracteres comportamentais.....	23
Desenvolvimento de ovários das fêmeas.....	28
Resultados e Discussão.....	33
A- Conteúdo dos ninhos, população e ciclo colonial.....	33
Ninho Mt-1 de <i>Metapolybia miltoni</i>	33
Ninho Mt-2 de <i>Metapolybia miltoni</i>	35
Ninho Mt-3A e Mt-3B de <i>Metapolybia servilis</i>	36
Ninho Pp-1 de <i>Protopolybia picteti</i>	38
Ninho Pe-2 de <i>Protopolybia exigua</i>	39
Ninho Pe-3 e Ninho Pe-4 de <i>Protopolybia exigua</i>	41
Ninho Cc-1 de <i>Chartergellus communis</i>	42
Ninho Cg-2 de <i>Chartergellus golfitensis</i>	44
Ninho Cg-3 de <i>Chartergellus golfitensis</i>	45
Ninho Ps-1 e Ps-2 de <i>Polybia selvana</i>	46

Ninho Psp de <i>Polybia flavifrons</i>	47
Ninho Ps-1 e Ps-2 de <i>Brachygastra smithii</i>	47
B-Comportamento das rainhas, e sua interação com as operárias.....	48
Comportamentos de interação entre rainhas e operárias.....	53
Comportamentos não característicos de rainhas.....	58
Comportamento fêmeas recém emergidas.....	63
C- Seleção e Totipotência das rainhas.....	66
Estabelecimento das rainhas	67
Totipotência das fêmeas.....	73
Seleção das rainhas.....	80
D- Comportamentos associados ao processo de seleção.....	88
<i>Metapolybia</i>	88
<i>Chartergellus</i>	95
<i>Protopolybia</i> e <i>Polybia</i>	98
Considerações finais sobre o processo de seleção.....	103
E- Evolução do processo de seleção e eliminação de rainhas em Epiponini.....	105
Conclusões.....	114
Referências.....	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hipótese filogenética da evolução das castas para a tribo Epiponini relacionada com controle reprodutivo, baseada em Noll e Wenzel (2008), otimizada na árvore proposta por Wenzel e Carpenter (1994).....	09
Figura 2. Ninho de <i>Metapolybia miltoni</i> estudado em Fronteira Minas Gerais (A), ninho de <i>M. miltoni</i> estudado no campi da USP em Ribeirão Preto São Paulo (B), e ninho de <i>M. servilis</i> estudado em Golfito, Puntarenas, Costa Rica (C).....	14
Figura 3. Ninho Cc-1 de <i>Chartergellus communis</i> estudado na cidade de Pedregulho, São Paulo (A), e ninhos Cg-2 (B) e Cg-3 (C) de <i>C. golfitensis</i> estudado em Golfito, Puntarenas, Costa Rica no ano 2011 e 2012 respectivamente.....	15
Figura 4. Ninho Pp-1 de <i>Protopolybia picteti</i> observado em Golfito, Puntarenas, Costa Rica (A), e ninhos Pe-2 (B) Pe-4 (C) de <i>P. exigua</i> observados no campi da USP em Ribeirão Preto São Paulo.....	16
Figura 5. Ninhos Ps-1 (A) e Ps-2 (B) de <i>Polybia selvana</i> , ninho P-1 de <i>Polybia</i> sp. (C) e ninho Br-1 de <i>Brachygastra smithii</i> (D) observados em Golfito, Puntarenas, Costa Rica.....	17
Figura 6. Categorias do grau de desenvolvimento dos ovários para as fêmeas das colônias estudadas. Desenho modificado de Noll et al., 1996; Baio et al., 2002; Mateus et al., 1997; e Mateus et al., 2004. Escala 1mm.....	30
Figura 7. Categorias de idade feitas para as fêmeas de <i>Metapolybia</i> , <i>Protopolybia</i> e <i>Chartergellus</i>	32
Figura 8. Comportamentos realizados com maior frequência pelas rainhas de A) <i>Chartergellus</i> (Cc-1= <i>C. communis</i> , Cg-2= <i>C. golfitensis</i> , Cg-3= <i>C. golfitensis</i> colônia-3); B) <i>Metapolybia</i> (Mt-1= <i>M. miltoni</i> , Mt-2= <i>M. miltoni</i> colônia 2, Mt-3A= <i>M. servilis</i> 2011, Mt-3B= <i>M. servilis</i> 2012); C) <i>Protopolybia</i> (Pp-1= <i>P. picteti</i> , Pe-2= <i>P. exigua</i> , Pe-3= <i>P. exigua</i> colônia-3, Pe-4= <i>P. exigua</i> colônia-4); e D) <i>Polybia</i> (Ps= <i>P. selvana</i> , Psp= <i>Polybia flavifrons</i>) e Bg= <i>Brachygastra smithii</i> . IC= Inspeção de célula, Tx= trofalaxis, BD1=	

bending display I, OV= ovipositar, Limp= autolimpeza, e Solc= solicitar.....52

Figura 9. Comportamentos de interação das rainhas com as operárias (barras de cor escuro: preto, laranja escuro, roxo) e das rainhas com outras rainhas (barras com cores claras: branco, laranja claro, lilás) das colônias A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-2= *C. golfitensis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) *Metapolybia* (Mt-1= *M. miltoni*, Mt-2= *M. miltoni* colônia 2, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); C) *Protopolybia* (Pp-1= *P. picteti*, Pe-2= *P. exigua*, Pe-3= *P. exigua* colônia-3, Pe-4= *P. exigua* colônia-4); e D) *Polybia* (Ps= *P. selvana*, Psp= *Polybia flavifrons*) e Bg= *Brachygastra smithii*. Tx= trofalaxis, Ant= antenar, Rant= recebe antenar, Solc= solicitar.....55

Figura 10. Comportamentos display e teste de interação entre rainhas e operárias das colônias A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-2= *C. golfitensis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) *Metapolybia* (Mt-1= *M. miltoni*, Mt-2= *M. miltoni* colônia 2, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); C) *Protopolybia* (Pp-1= *P. picteti*, Pe-2= *P. exigua*, Pe-3= *P. exigua* colônia-3, Pe-4= *P. exigua* colônia-4); e D) *Polybia* (Ps= *P. selvana*, Psp= *Polybia flavifrons*) e Bg= *Brachygastra smithii*. BD1= bending display I, RBD1= recebe bending display I, RWD= recebe worker dance, Sinv= sendo investida, Dv= desviar, SDv= causar desvio, SM= sendo mordida.....56

Figura 11. Comportamentos display e teste de interação entre rainhas das colônias A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) *Metapolybia* (Mt-1= *M. miltoni*, Mt-2= *M. miltoni* colônia 2, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); C) *Protopolybia* (Pp-1= *P. picteti*, Pe-2= *P. exigua*, Pe-4= *P. exigua* colônia-4); e D) *Brachygastra* (Bg= *Brachygastra smithii*). BD1= bending display I, RBD1= recebe bending display I, RWD= recebe worker dance, Inv= Investir, Sinv= sendo investida, Dv= desviar, Sdv= causar desvio, SM= sendo mordida.....57

Figura 12. Comportamentos característicos de operárias feitos pelas rainhas das colônias dos gêneros A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-2= *C. golfitensis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) intermediárias da colônia Cc-1 de *C. communis*; C) rainhas

de *Metapolybia* (Mt-1= *M. miltoni*, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); D) e rainhas de *Metapolybia miltoni* (Mt-2= colônia 2) atividades feitas por data de observação. CE= construção do envelope, Mc= macerar, Rmat= receber material, AC= aumentar célula, DivM= dividir material.....62

Figura 13. Comportamentos feitos pelas fêmeas recém emergidas das colônias Pp-1 de *Protopolybia picteti*, Cg-3 de *Chartergellus golfitensis* e Mt-3B de *Metapolybia servilis* (IC= inspeção de célula, Tx= trofalaxis, Limp= auto limpeza, CE= construção do envelope, DivMat= dividir material, Rmat= receber material, Ant= antenar, Rant= receber antenação, AC= aumentar célula, Mc= macerar).....64

Figura 14. Grau de desenvolvimento dos ovários e idade das rainhas “originais” (Rorg), rainhas novas (RN), e operárias que foram observadas em posição de ovipositar (P) após a remoção das rainhas “originais” nas colônias Mt-3A de *Metapolybia servilis* (A), Pp-1 de *Protopolybia picteti* (B), Cc-1 de *Chartergellus communis* (C), Cg-2 de *C. golfitensis* (D), e Cg-3 de *C. golfitensis* (E). As cores representam a idade das fêmeas (MC para indivíduos jovens, PG para os mais velhos; ver figura 7). Os códigos entre parêntesis no eixo horizontal representam o estado de desenvolvimento dos ovários (ver figura 6).....79

Figura 15. Frequência média dos comportamentos *display* feitos e recebidos pelas rainhas, e da oviposição na colônia Mt-2 de *Metapolybia miltoni* durante as semanas de observação antes da seleção. Os quadros representam a média e as barras o desvio padrão. A) Frequência média do comportamento *bending display* tipo I (BD1); B) frequência média do comportamento investir (Inv); C) frequência média com que as rainhas receberam o comportamento *worker dance* (RWD); D) frequência média com que as rainhas receberam o comportamento *bending display* tipo I (RBD1); E) frequência média com que as rainhas foram investidas (SInv); F) frequência média da postura de ovos (OV).....83

Figura 16. Resposta das rainhas ante os comportamentos de teste feitos por outras fêmeas na colônia Mt-2 de *Metapolybia miltoni*. A) Resposta das rainhas quando

receberam o comportamento de *bending display* tipo I (RBD1), B) resposta das rainhas ante o comportamento sendo investida (SInv), C) resposta das rainhas ante o comportamento de *worker dance* (RWD). Dv= desviar, NR= não responde, ANT= antenar, BD= *bending display*, TTX= regurgitar.....84

Figura 17. Frequência média dos comportamentos *display* feitos e recebidos pelas rainhas selecionadas (V65, N17, N18, N19, N21, N23, N28) e eliminadas (N16, V74, N20, N22, V91), e da oviposição na colônia Cg-3 de *Chartergellus golfitensis* durante as semanas de observação após a eliminação das rainhas “originais”. Os quadros representam a média e as barras o desvio padrão. A) Frequência média do comportamento *bending display* tipo I; B) frequência média com que as rainhas receberam o comportamento *worker dance*; C) frequência média da postura de ovos.....85

Figura 18. Resposta das rainhas selecionadas (V65, N17, N18, N21, N23) e eliminadas (V74), ante os comportamentos de teste feitos por outras fêmeas na colônia Cg-3 de *Chartergellus golfitensis*. A) Resposta das rainhas quando receberam o comportamento de *bending display* tipo I (RBD1) B) resposta das rainhas ante o comportamento *worker dance* (RWD). Dv= desviar, NR= não responde.....86

Figura 19. Comportamentos de *display* e teste feitos pelas rainhas das colônias de *Metapolybia* durante o período de observação (barra indica período de seleção, seta indica a eliminação da rainha) em relação com a quantidade de rainhas. A) Mt-2= *Metapolybia miltoni*. Em **Ai** estão representadas as frequências dos comportamentos sem correção, em **Aii** as frequências foram corrigidas pela quantidade de rainhas e o tempo de observação. B) Mt-3A= *Metapolybia servilis* 2011. **Bi** frequência sem correção, **Bii** frequência corrigida. C) Mt-3B= *M. servilis* 2012. **Ci** frequência sem correção, **Cii** frequência corrigida. BD1= *bending display* I, BD2= *bending display* II, RBD1= recebe *bending display* I, RWD= recebe *worker dance*, Inv= Investir, SInv= sendo investida, Sdv= causar desvio, M= morder, SM= sendo mordida.....93

Figura 20. Comportamentos de *display* feitos entre rainhas e entre rainhas e operárias

durante o período de observação da colônia de Mt-2 de *Metapolybia miltoni*. BD1 R-O= *bending display* tipo I entre rainhas e operárias; BD1 R-R= *bending display* tipo I entre rainhas; RBD1 R-O= quando as rainhas recebem o *bending display* tipo I de operárias; RBD1 R-R= quando as rainhas recebem o *bending display* tipo I de outras rainhas; Inv R-O= investida entre rainhas e operárias; Inv R-R= investida entre rainhas.....94

Figura 21. Comportamentos de *display* e teste feitos pelas rainhas das colônias de *Chartergellus* durante o período de observação em relação com a quantidade de rainhas (seta indica a eliminação da rainha). A) Cc-1= *Chartergellus communis*. Em **Ai** estão representadas as frequências dos comportamentos sem correção, em **Aii** as frequências foram corrigidas pela quantidade de rainhas e o tempo de observação. B) Cg-2= *Chartergellus golfitensis*. **Bi** frequência sem correção, **Bii** frequência corrigida. C) Cg-3= *C. golfitensis*. **Ci** frequência sem correção, **Cii** frequência corrigida. BD1= *bending display* I, RWD= recebe *worker dance*, Inv= Investir, Sinv= sendo investida, Dv= desvio, Sdv= causar desvio, SM= sendo mordida.....99

Figura 22. Nova rainha expulsa da colônia durante o processo de seleção escondida num canto fora do ninho da colônia Cc-1 de *Chartergellus communis*.....100

Figura 23. Comportamentos de *display* e teste feitos pelas rainhas das colônias de *Protopolybia* durante o período de observação em relação com a quantidade de rainhas (seta indica a eliminação da rainha). A) Pp-1=*Protopolybia picteti*. Em **Ai** estão representadas as frequências dos comportamentos sem correção, em **Aii** as frequências foram corrigidas pela quantidade de rainhas e o tempo de observação. B) Pe-2= *Protopolybia exigua*. **Bi** frequência sem correção, **Bii** frequência corrigida. C) Pe-4= *P. exigua* N-4. **Ci** frequência sem correção, **Cii** frequência corrigida. BD1= *bending display* I, RBD1= recebe *bending display* I, BD2= *bending display* II, RWD= recebe *worker dance*, SDv= causar desvio, SM= sendo mordida.....102

Figura 24. Hipótese filogenética da evolução dos caracteres associados ao processo de seleção e eliminação de rainhas para a tribo Epiponini otimizada na árvore proposta por Wenzel e Carpenter (1994).....108

Introdução

Os insetos sociais distinguem-se, dentre outras características, pela divisão do trabalho reprodutivo com uma casta, a das rainhas, que estão encarregadas exclusivamente da reprodução, e outra, a das operárias, indivíduos não reprodutivos que cuidam de todas as tarefas coloniais (podendo apresentar divisão de trabalho) (Wilson, 1971; Hanson, Gauld, 2006). As castas podem ser determinadas durante os estágios imaturos (determinação pré-imaginal), ou durante o estágio adulto (determinação imaginal) (Wheeler, 1991). Quando a determinação é pré-imaginal há diferenças morfológicas entre as castas (Wheeler, 1991). Por outro lado, quando a determinação é imaginal as diferenças morfológicas entre as castas podem ser ausentes ou pouco evidentes.

Nos Hymenoptera encontram-se diferentes níveis de organização social, desde insetos primitivamente eussociais (como as vespas do gênero *Polistes* e *Myschocyttarus*) até insetos altamente sociais como as formigas e as abelhas *Apis mellifera*. Nos neotrópicos existem mais de três mil espécies de Hymenoptera eussociais que incluem todas as formigas (Formicidae), algumas abelhas da subfamília Halictinae e das tribos Bombini, Meliponini e Apini de Apidae, assim como as vespas das subfamílias Vespinae e Polistinae de Vespidae, e um gênero de Crabronidae (Pemphredoninae: *Microstigmus*) (Hanson, Gauld 2006).

Vespidae é um grupo de grande interesse para o estudo da evolução do comportamento social por apresentar diferentes níveis de organização, desde grupos com modo de vida solitário (Euparagiinae, Masarinae e Eumeninae) e subsocial (Stenogastrinae), até grupos eussociais (Polistinae e Vespinae) (Richards, 1978). Em

Polistinae, a maioria das vespas dos gêneros *Polistes*, *Mischocyttarus*, *Belanogaster*, *Parapolybia* e *Ropalidia* apresentam pelo menos uma fase solitária no ciclo de vida, fundando a colônia de maneira independente (Carpenter, 1991; Jeanne, 1991). Por outro lado, todos os Epiponini, alguns Ropalidiini e *Polybiodes* fundam as colônias por meio de enxames, sendo considerados altamente eussociais.

Os Epiponini são um grupo de insetos sociais formado por 19 gêneros encontrados exclusivamente no Neotrópicos, com distribuição desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. Essas vespas são caracterizadas pela fundação de colônias por meio de enxames, onde um grande número de indivíduos, incluindo operárias e rainhas, separa-se de maneira sincronizada da colônia original para fundar uma nova (West-Eberhard, 1982). Também são caracterizadas por apresentarem colônias com muitas rainhas (poliginia) que variam em número durante o ciclo colonial (West-Eberhard, 1978). A variação no número de rainhas durante o ciclo colonial implica na ocorrência de muitas (poliginia) e poucas rainhas (oligoginia); mas em algumas espécies (*Metapolybia azteca*: West-Eberhard, 1978) o número de rainhas pode diminuir chegando a uma única (monoginia). West-Eberhard (1978) e Noll e Zucchi (2000, 2002) observaram que o ciclo colonial para algumas espécies (*M. aztecoides*: West-Eberhard, 1978; *Polybia occidentalis*, *Po. Paulista*, *Po. Scutellaris*: Noll, Zucchi, 2000; *Apoica flavíssima*, *Protopolybia exigua* e *Chartergus globiventris*: Noll, Zucchi, 2002) tem início com um processo de crescimento, onde as colônias têm um número maior de rainhas, mas conforme a colônia cresce o número de rainhas diminui e as novas rainhas não serão produzidas até a fase reprodutiva onde o número reduz para uma ou poucas fêmeas (Jeanne, 1991). Segundo West-Eberhard (1978) algumas rainhas podem abandonar o ninho junto com outras vespas para fundar uma nova colônia, ou continuar dentro da colônia e tornar-se operárias, ou podem ser expulsas do ninho por outras rainhas e operárias. As rainhas testam outras rainhas por meio do *bending display*, e as

operárias testam por meio do *shaking* ou *worker dance*; se as potenciais rainhas respondem de forma submissa ante os testes são eliminadas da colônia (West-Eberhard, 1978).

Os Epiponini também são caracterizados por apresentarem diferentes síndromes de castas morfológicas. Segundo Noll et al. (2004), as castas evoluíram de diferentes formas em linhagens diferentes nos Epiponini e, portanto, as diferenças morfométricas não podem ser explicadas por uma única hipótese envolvendo alometria como em outros insetos sociais. Noll et al. (2004) propõem quatro síndromes de discriminação de castas para Epiponini: 1) sem casta (onde não há diferenças no tamanho ou forma associados com a reprodução); 2) castas fisiológicas apenas (ausência de diferenças morfométricas entre as castas, no entanto as fêmeas podem ser separadas pelo grau de desenvolvimento dos ovários); 3) rainhas maiores mas com a mesma forma; 4) rainhas com tamanho e forma diferente das operárias.

Como mencionado anteriormente, a determinação de castas não pode ser explicada por uma única teoria de diferenciação, uma vez que algumas espécies tem determinação pré-imaginal (*Agelaia*, *Apoica*, *Polybia*, *Protopolybia*, *Chartergus* e *Pseudopolybia*, Noll et al., 2004); e outras espécies tem determinação imaginal (*Metapolybia*, *Synoeca*, *Chartergellus*, *Parachartergus*, etc., Noll et al., 2004). Nas espécies com determinação imaginal, todas as fêmeas ao emergir poderiam desenvolver os ovários e atingir o status de rainha: esta característica poderia gerar conflitos sobre a reprodução entre os indivíduos da colônia, uma vez que as operárias da mesma forma que as rainhas, poderiam botar ovos (Hart, Ratnieks, 2005).

O fato das colônias dos Epiponini apresentarem várias rainhas poderia levar também a conflitos pela reprodução. A poliginia poderia gerar um parentesco menor entre as fêmeas da colônia (Hastings et al., 1998; Herman et al., 2000; Strassmann et al., 2002; Noll, Wenzel, 2008); entretanto, diferentes estudos tem mostrado que o

relacionamento genético entre os membros da colônia não é tão baixo (Gastreich et al., 1993; Strassmann et al., 1991; Strassmann et al., 1992; Hastings et al., 1998). Mesmo assim, neste contexto as operárias que são maioria dentro das colônias poderiam ter uma vantagem para regular a produção de rainhas (Hastings et al., 1998; Herman et al., 2000). Elas podem ter evoluído para maximizar seu *fitness* (maximizar os interesses coletivos da casta) suprimindo a produção de novas rainhas dentro da colônia durante a maior parte do ciclo colonial para aumentar o parentesco entre as fêmeas (Queller et al., 1993). Como consequência disso, as rainhas velhas sempre serão selecionadas em detrimento das novas, e a produção de novas rainhas só será favorecida pelas operárias quando o número de rainhas velhas for muito baixo (Strassmann et al., 2002).

O controle reprodutivo nos vespídeos pode ser feito de duas formas: por meio de agressão física (vespas primitivamente sociais), ou por meio de controle químico. Dentro das colônias de vespas primitivamente eussociais (*Polistes*, *Mischocyttarus*, *Belanogaster*, *Parapolybia* e *Ropalidia*) há uma hierarquia de dominância, onde a fêmea com maior desenvolvimento de ovários é a encarregada de botar todos os ovos (Fletcher, Ross, 1985). Como a diferenciação de castas é imaginal, e qualquer fêmea poderia botar ovos, a rainha mantém seu status dentro da colônia por meio de agressão física e oofagia. Quando a rainha está ausente, pode ser substituída por uma das fêmeas co-fundadoras do ninho, ou por aquela com maior desenvolvimento de ovários (Spradbery, 1991). A rainha monopoliza a produção de ovos, mas ela também pode forragear ocasionalmente e iniciar a construção de novas células.

Por outro lado, em Vespinae a determinação de castas é pre-imaginal e determinada desde o estado larval (Spradbery, 1991). As rainhas exercem um controle químico sobre as operárias, que desenvolvem seus ovários somente quando a rainha é ausente (Spradbery, 1991). As novas rainhas são criadas em células maiores, no entanto se a rainha morrer e não houver novas reprodutoras dentro da colônia,

começará uma luta entre as operárias para determinar qual fêmea substituirá a rainha (Spradbery, 1991). Quando uma nova rainha é estabelecida dentro do ninho, os comportamentos agressivos diminuem e a colônia continua seu ciclo normalmente. O controle químico tem várias vantagens: implica um menor gasto de energia em relação com o controle físico, uma vez que os indivíduos não tem que lutar entre eles para determinar quem botara a maior parte dos ovos (Downing, 1991). Também pode ser uma vantagem em colônias grandes, onde a capacidade da rainha em manter seu status por meio de dominância física pode ser reduzida devido a grande quantidade de indivíduos que teria para controlar (Downing, 1991).

Nos Epiponini, agressão física foi observada somente durante a fase de estabelecimento e seleção de rainhas (Mateus, 2005); no entanto não é frequente a agressão física por parte da rainha contra as operárias para manter seu status dentro da colônia. Por este motivo, acredita-se que dentro das colônias de Epiponini o controle reprodutivo também é feito por meio de sinalização química ou controle hormonal (Naumann, 1970; West-Eberhard, 1977; Forsyth, 1978; Fletcher, Ross, 1985; Spradbery, 1991), embora ainda nenhum estudo tenha comprovado esse fenômeno. No entanto, diferente de Vespinae, parece que as rainhas utilizam posturas ritualizadas junto com os sinais químicos para comunicar seu status dentro das colônias (West-Eberhard, 1978; Spradbery, 1991). Como mencionado anteriormente, o controle reprodutivo dentro das colônias não é feito unicamente pelas rainhas, as operárias também podem suprimir o desenvolvimento de ovários de outras fêmeas e controlar o número de rainhas mediante controle comportamental (West-Eberhard, 1978; Herman et al., 2000; Strassmann et al., 2002; Platt et al., 2004). Esse tipo de controle provavelmente é feito em espécies com determinação imaginal, mas ainda não se sabe se existe outro tipo de controle, uma vez que até agora foram feitos poucos estudos sobre as mudanças comportamentais que ocorrem nas fêmeas adultas, potenciais

rainhas.

Estudar as diferenças comportamentais entre rainhas e operárias e as mudanças relacionadas ao processo de seleção é importante, uma vez que para muitas espécies de Epiponini a única forma de separar as fêmeas reprodutoras das não reprodutoras é pelo comportamento, ou pelo grau de desenvolvimento de ovários (Noll et al., 2004). Nos estudos feitos até agora foi demonstrado que o comportamento pode ser um componente importante no mecanismo de delimitação das funções na colônia (*Protopolybia pumilia*: Naumann, 1970; *Metapolybia aztecoides*: West-Eberhard, 1973, 1978; *Parachartergus colobopterus*: Herman et al., 2000; *Asteloeca ujhelyii*: Nascimento et al., 2004; *Parachartergus fraternus*: Mateus, 2005; *Metapolybia docilis*: Chavarría, 2009).

Os poucos modelos comportamentais estudados não conseguem explicar toda a variação encontrada (Noll, Wenzell, 2008). A tribo Epiponini apresenta uma grande variação taxonômica (Wenzel, Carpenter, 1994), de diferenciação morfológica entre castas (Noll et al., 2004; Noll, 2005), arquitetura de ninhos (Wenzel, 1998), tamanho colonial e distribuição (Jeanne, 1991); por este motivo tentar explicar a variação das estratégias comportamentais baseados no estudo de poucas espécies não é suficiente. Nos estudos feitos até o momento foram encontradas diferenças das interações entre rainhas e operárias, dos comportamentos feitos pelas rainhas, da divisão de trabalho entre as operárias, assim como dos comportamentos que caracterizam as diferentes fases do ciclo colonial. O estudo sobre a biologia comportamental e as interações entre as fêmeas de diferentes espécies ajudarão no entendimento da evolução e surgimento das estratégias associadas ao controle reprodutivo, e ao ciclo colonial.

Objetivo

Pelo exposto acima, o objetivo geral deste trabalho foi estudar o comportamento de rainhas e operárias nas fases coloniais de produção e eliminação de rainhas para quatro gêneros de Epiponini a fim de testar a hipótese de que existe variação comportamental entre as castas nas diferentes espécies e que elas seguem um padrão filogenético.

Objetivos Específicos

- Estudar e descrever os comportamentos referentes à interação entre operárias e rainhas em colônias órfãs por meio de testes de remoção de rainhas.
- Estudar a interação das operárias com as fêmeas recém-emergidas e seu comportamento nas diferentes fases do ciclo colonial, assim como em colônias órfãs.
- Observar se em colônias órfãs as recém-emergidas podem se tornar rainhas.
- Estudar a totipotência das fêmeas em colônias órfãs.
- Estudar filogeneticamente a evolução dos comportamentos e interações entre as fêmeas através da otimização de caracteres comportamentais em uma filogenia prévia.

Materiais e Métodos

Descrição das espécies

As espécies escolhidas pertencem a diferentes clados dentro da filogenia mais aceita para os Epiponini (Fig. 1). O estudo foi conduzido utilizando-se as seguintes espécies de Epiponini: *Metapolybia* (*Metapolybia miltoni* Andena, 2011 e *Metapolybia servilis* Cooper, 1999) (Fig. 2); *Chartergellus* (*Chartergellus communis* Richards, 1978 e *Chartergellus golfitensis* West- Eberhard, 2010) (Fig. 3); *Protopolybia* (*Protopolybia exigua* de Saussure, 1854 e *Protopolybia picteti* de Saussure, 1854) (Fig. 4); e *Polybia* (*Polybia selvana* Carpenter, 2002 e *Polybia flavifrons* Smith, 1857) (Fig. 5). Adicionalmente foram feitas observações em uma colônia de *Brachygastra smithii* (de Saussure, 1854) para se ter um melhor conhecimento do comportamento dos indivíduos dentro do clado de *Polybia*. Conforme discutido em Noll e Wenzel (2008), os clados em questão teriam tido sua gênese a partir de um plano básico “sem-castas” e a reaquisição de castas teria surgido a partir de *Charterginus* (Fig. 1). Em consequência, o modelo “sem castas” pode ser observado em suas diferentes formas, utilizando-se as espécies selecionadas. Para as espécies selecionadas até agora não há estudos sobre comportamento e interações das fêmeas relacionados com a fase de produção de rainhas, à exceção de *Metapolybia* (West-Eberhard, 1978).

Em *Chartergellus* ocorrem ninhos do tipo stelocítaros caliptódomos. Stelocítaro refere-se ao favo que é fixado ao substrato por um pedicelo e caliptódomo ao ninho com envelope (Wenzel, 1991). Em *Chartergellus* o envelope é de fácil remoção, facilitando as observações devido aos favos não estarem unidos ao envelope (Fig. 3). Os comportamentos e as interações entre as fêmeas da colônia são pouco conhecidas para o gênero; até agora somente o trabalho publicado por Chavarria e West-Eberhard

(2010) descreve com detalhe alguns dos comportamentos característicos das operárias e rainhas de *C. golfitensis*. Entretanto, os comportamentos relacionados à fase de produção e seleção de rainhas ainda não foram estudados. *C. communis* é endêmica do Brasil (Richards, 1978), *C. golfitensis* foi descrita por West-Eberhard et al. (2010), com registros apenas para a Costa Rica.

Figura 1. Hipótese filogenética da evolução das castas para a tribo Epiponini relacionada com controle reprodutivo, baseada em Noll e Wenzel (2008), otimizada na árvore proposta por Wenzel e Carpenter (1994).

Metapolybia é encontrado da Costa Rica até o Brasil (Richards 1978). É caracterizado por apresentar ninhos do tipo astelocítaros onde o favo esta unido diretamente ao substrato (Wenzel, 1991, 1998). Estudos anteriores (West-Eberhard, 1978; Karsai, Wenzel, 2000; Chavarría, 2009) demonstraram ser um gênero de fácil observação devido à baixa agressividade das fêmeas, e à facilidade de se remover o envelope do ninho para as observações (Fig. 2). Também é um gênero interessante devido à complexidade nas relações entre rainhas e operárias. *Metapolybia miltoni* também é uma espécie descrita recentemente para o Brasil (Andena, Carpenter, 2011), de modo que a biologia da espécie é pouco conhecida. Os comportamentos dos indivíduos e de interação também são poucos conhecidos para *M. servilis*, porque até agora não foram feitas observações do comportamento desta espécie.

Protopolybia exigua é uma espécie encontrada na Costa Rica, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Brasil (Richards, 1978), os ninhos são do tipo stelocítaros caliptódomo, mas diferentemente de *Chartergellus* só o primeiro favo é unido ao substrato, sendo que os outros favos são unidos entre si mediante pedúnculos (Fig. 4). Também é caracterizada por formar colônias pequenas. Para essa espécie foram feitos estudos principalmente de determinação de castas (Noll et al., 1996; Simões, 1977), comportamento (Simões, 1977), forrageamento (Ribeiro Junior et al., 2006) e relacionamento genético entre as fêmeas (Gastreich et al., 1993). *Protopolybia picteti* é pouco conhecida ao nível taxonômico (Carpenter comunicação pessoal) e biológico; é encontrada na Costa Rica, Panamá, Colombia e Venezuela (Richards, 1978).

Polybia selvana é uma espécie que até agora foi encontrada somente na Costa Rica. Segundo Carpenter e Kojima (2002), a espécie somente foi coletada na estação biológica La Selva em Sarapiquí província de Heredia, entretanto no presente estudo dois ninhos foram encontrados em Golfito, província de Puntarenas no sul do país. Os ninhos são do tipo fragmocítaros pequenos, formados por dois ou três favos geralmente.

Fragmocítaro refere-se que os favos estão unidos ao envelope do favo anterior. Mesmo assim, o envelope é de fácil remoção (Wenzel, 1998) (Fig 5-A,B). A biologia e o comportamento de *P. selvana* são desconhecidos. *Polybia flavifrons* é uma espécie com ampla distribuição, algumas subespécies são encontradas desde Costa Rica até Argentina (Richards, 1978). A espécie estudada é afim com *Polybia flavifrons barbatula*, mas é provável que seja *Polybia flavifrons hecuba* por causa da distribuição (Richards, 1978). *P. flavifrons* pertence ao grupo “*Polybia occidentalis*”, até agora foram feitos muitos estudos sobre o comportamento das operárias (O'Donnell et al., 1997; O'Donnell, 2001a, 2006) sobre a divisão de trabalho (Jeanne, 1986; O'Donnell, Jeanne, 1993, 1995a,b; O'Donnell, 2001b; Loope, Jeanne, 2008) entre outros, mas não sobre o comportamento das rainhas e suas interações com as operárias, possivelmente pela arquitetura do ninho que dificulta as observações. *Brachygastera smithii* é uma espécie de ampla distribuição, é encontrada desde o México até o Brasil (Richards, 1978). Mesmo assim, sua biologia é pouco conhecida e da mesma forma que as espécies utilizadas neste estudo as interações entre as fêmeas e o comportamento das rainhas não tem sido estudado até agora. Os ninhos também são fragmocítaros o que dificulta fazer observações do comportamento dos indivíduos dentro do ninho (Fig 5-D).

Localidades de estudo

Foram observados os comportamentos das fêmeas de 12 colônias: três de *Metapolybia*, três de *Chartergellus*, quatro de *Protopolybia*, três de *Polybia* e uma de *Brachygastera*. Em total foram feitas 844 horas de observações diretas. As informações referentes às localidades de estudo, dias e horas de observação estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Informações sobre os ninhos das espécies utilizadas para realizar as observações dos comportamentos.

Espécie	Ninho	Localidade	Período de observação	Frequência	Horas de observação	Figura
<i>Metapolybia miltoni</i>	Mt-1	Fronteira, MG, Brasil	04/11/09 a 16/12/09	Uma vez por semana	Quatro por dia	Fig. 2-A
<i>M. miltoni</i>	Mt-2	USP-Ribeirão Preto, SP, Brasil	18/09/10 a 01/12/10, e 31/01/12 a 23/02/12	Duas vezes por semana	Quatro por dia	Fig. 2-B
<i>M. servilis</i>	Mt-3 ^a	Refugio Nacional de Vida Silvestre, Golfito, Puntarenas, Costa Rica	12/04/11 a 25/05/11	Duas vezes por semana	Quatro por dia	Fig. 2-C
<i>M. servilis</i>	Mt-3B	RNVS Golfito, Puntarenas, CR.	20/02/12 a 03/05/12	Duas vezes por semana a cada 10 dias	Seis horas por dia	Fig. 2-C
<i>Chartergellus communis</i>	Cc-1	Pedregulho, SP, Brasil	07/05/10 a 11/11/10	Duas vezes por semana	Quatro por dia	Fig. 3-A
<i>C. golfitensis</i>	Cg-2	RNVS Golfito, Puntarenas, CR.	22/04/11 a 24/05/11	Duas vezes por semana	Quatro por dia	Fig. 3-B
<i>C. golfitensis</i>	Cg-3	RNVS Golfito, Puntarenas, CR.	20/02/12 a 19/06/12	Duas vezes por semana a cada 10 dias	Seis horas por dia	Fig. 3-C
<i>Protopolybia picteti</i>	Pp-1	RNVS Golfito, Puntarenas, CR.	11/04/11 a 23/05/11	Duas vezes por semana	Quatro por dia	Fig. 4-A
<i>P. exigua</i>	Pe-2	USP-Ribeirão Preto, SP, Brasil	09/09/11 a 02/12/11	Duas vezes por semana	Quatro por dia	Fig. 4-B
<i>P. exigua</i>	Pe-3	USP-Ribeirão Preto, SP, Brasil	26/10/11 a 17/12/11	Duas vezes por semana	Quatro por dia	
<i>P. exigua</i>	Pe-4	USP-Ribeirão Preto, SP, Brasil	17/12/11 a 01/02/12	Duas vezes por semana	Quatro por dia	Fig. 4-C
<i>Polybia selvana</i>	Ps-1	Parque Nacional Piedras Blancas, Puntarenas, CR	15/02/12 a 19/02/12		Sete por dia	Fig. 5-A
<i>P. selvana</i>	Ps-2	RNVS Golfito, Puntarenas, CR.	08/03/12 a 10/03/12		Cinco por dia	Fig. 5-B
<i>P. flavifrons</i>	P-3	RNVS Golfito, Puntarenas, CR.	19/04/12 a 18/06/12	Duas vezes por semana a cada 10 dias	Quatro por dia	Fig. 5-C
<i>Brachygastra smithii</i>	Br-1	RNVS Golfito, Puntarenas, CR.	19-20/05/12 e 05-06/06/12		Cinco por dia	Fig. 5-D

Uma colônia (Mt-3) de *M. servilis* foi observada durante o ano de 2011 no Refugio de Vida Silvestre Golfito em Puntarenas, Costa Rica (8°39'25"N latitude, 83°11'55" E longitude) (Tabela 1). A mesma colônia foi encontrada durante a segunda visita à Costa Rica no ano de 2012, então foram feitas observações adicionais nesta colônia (Tabela 1). Duas colônias de *P. selvana* e uma de *B. smithii* foram observadas na Costa Rica (Tabela 1), apesar das observações terem sido feitas por poucos dias uma vez que os indivíduos não toleraram as manipulações feitas e enxamearam. Os ninhos foram procurados durante vários dias, mas nunca foram encontrados. Em consequência, nem os testes de remoção nem as observações sobre o processo de seleção de rainhas puderam ser feitos para as espécies de *Polybia*. Entretanto, foram feitas observações do comportamento das rainhas dentro das colônias, das suas interações com as operárias, e dos comportamentos das operárias para as rainhas. Estas informações serão utilizadas na otimização filogenética, e para analisar a evolução dos comportamentos de interação entre castas na tribo Epiponini.

Figura 2. Ninho Mt-1 de *Metapolybia miltoni* estudado em Fronteira (MG) (A), ninho Mt-2 de *M. miltoni* estudado no campus da USP em Ribeirão Preto (SP) (B), e ninho Mt-3 de *M. servilis* estudado em Golfito, Puntarenas, Costa Rica (C).

Figura 3. Ninho Cc-1 de *Chartegellus communis* estudado na cidade de Pedregulho (SP) (A), e ninhos Cg-2 (B) e Cg-3 (C) de *C. golfitensis* estudado em Golfito, Puntarenas, Costa Rica em 2011 e 2012 respectivamente.

Figura 4. Ninho Pp-1 de *Protopolybia picteti* observado em Golfito, Puntarenas, Costa Rica (A), e ninhos Pe-2 (B) Pe-4 (C) de *P. exigua* observados no campus da USP em Ribeirão Preto (SP).

Figura 5. Ninhos Ps-1 (A) e Ps-2 (B) de *Polybia selvana*, ninho Psp de *Polybia flavifrons*. (C) e ninho Br-1 de *Brachygastra smithii* (D) observados em Golfito, Puntarenas, Costa Rica.

Análises comportamentais

Para realizar as observações do comportamento das rainhas e operárias foram utilizadas colônias em diferentes fases do ciclo colonial. A fase do ciclo em que a colônia estava foi determinada baseando-se nas descrições de Noll e Zucchi (2002), avaliando-se o conteúdo das células, a quantidade de rainhas na colônia, e a presença de machos. Entretanto, também foram usadas as descrições feitas por outros pesquisadores em outras espécies (Noda et al., 2003; Baio et al., 2003; Nascimento, 2004; Mateus, 2005) sobre as características das diferentes fases do ciclo. Como em alguns casos foi difícil de se identificar a fase de produção de rainhas, e algumas colônias não estavam em fase de seleção, testes de remoção de rainhas foram feitos em algumas colônias para induzir a produção de novas rainhas e observar as respostas comportamentais dos indivíduos numa colônia órfã.

Durante os primeiros dias de observação foram anotados os comportamentos realizados com maior frequência pelas fêmeas sem realizar nenhum tipo de teste durante este período. Foram anotados principalmente os comportamentos associados às interações entre operárias e rainhas (previamente marcadas) e entre operárias e rainhas com fêmeas recém-emergidas, para determinar se existe algum tipo de comportamento de *display*, teste de dominância, comportamento agressivo ou comportamentos característicos das rainhas.

Para realizar as observações dos comportamentos, uma parte do envelope dos ninhos foi removida (Figs. 2-5). Para diferenciar as rainhas das outras fêmeas da colônia, ovos foram removidos das células para induzir a oviposição. Aquelas fêmeas que foram observadas fazendo postura de ovos foram marcadas com um código individual de cores. O código foi feito em relação à localização das cores nas diferentes partes do corpo utilizando tinta não tóxica para as marcações. Uma amostra de

operárias e fêmeas recém-emergidas também foi marcada para realizar observações focais dos indivíduos.

Os testes de remoção de rainhas (para promover a produção de novas rainhas) foram feitos nas colônias Mt-2 de *M. miltóni*, Mt-3A e Mt-3B de *M. servilis*, Pp-1 de *Protopolybia picteti*, Pe-4 de *P. exigua*, Cc-1 de *Chartergellus communis*, e Cg-2 e Cg-3 de *C. golfitensis*. Em cada colônia foram removidas as fêmeas que foram observadas fazendo postura e que fizeram comportamentos característicos de rainhas. Posteriormente, as fêmeas removidas foram dissecadas para determinar o grau de desenvolvimento dos ovários e a inseminação através do conteúdo da espermateca. Os testes de remoção foram feitos por um período de três a cinco dias (Strassmann et al., 2002) dependendo da quantidade de rainhas e do tamanho do ninho. No caso de *C. communis*, *C. golfitensis* e *M. miltóni* (USP) as remoções foram feitas durante um dia (devido a pouca quantidade de rainhas presentes na colônia), no caso de *M. servilis* durante dois dias, no caso de *P. picteti* durante três dias, e em *P. exigua* de três a cinco dias.

O comportamento das operárias com as fêmeas recém-emergidas foi estudado para observar a existência de algum tipo de controle comportamental que poderia suprimir a capacidade reprodutiva das fêmeas recém emergidas, ou se o controle era feito por outro mecanismo. Entretanto, poucas fêmeas recém emergidas foram marcadas devido a dificuldade em marcar os indivíduos quando estavam emergindo das células (em alguns casos isso é muito rápido, e a arquitetura dos ninhos dificulta o acesso às células).

Para quantificar os comportamentos foram feitas observações diretas das rainhas e fêmeas recém-emergidas durante todo o tempo que puderam ser observadas. Também foram feitas filmagens (utilizando-se uma filmadora digital modelo Sony Handycam DCR-SR42) do comportamento das fêmeas incluindo aqueles momentos em

que as observações diretas não estavam sendo realizadas. Das observações diretas e de vídeo foram descritos diferentes atos comportamentais, que geraram um catálogo de comportamentos cujas descrições se seguem:

1. Inspeção de célula (IC): o indivíduo insere a cabeça no interior da célula.
2. Postura de Ovos (OV): ocorre após a inspeção repetida de uma célula. A rainha introduz todo o abdômen na célula e fica com o tórax e a cabeça fora da célula. As asas permanecem abertas num ângulo aproximado de 20° durante a postura.
3. Fixar o ovo (FXO): ocorre após a postura, a rainha insere a cabeça no interior da célula e toca o ovo com o aparelho bucal e/ou com as antenas.
4. Vigilância (V): a rainha permanece sobre a célula após a postura.
5. Remover (Rm): quando um indivíduo remove a rainha de uma célula onde estava fazendo inspeção, fixando o ovo, ou ovipositando.
6. Lamber ovo (LOv): quando um indivíduo lambe o ovo que outra fêmea botou.
7. Investir (Inv): quando um indivíduo (rainha ou operária) caminha rapidamente em direção a outro indivíduo (rainha ou operária). Durante o comportamento o indivíduo parece morder ou tocar o receptor, mas não há contato físico.
8. Sendo Investida (SInv): o indivíduo observado recebe de outro a investida.
9. Antenar (Ant): quando o indivíduo observado roça as antenas de cima para baixo contra o clipeo e frons de outro.
10. Receber antenação (Rant): um indivíduo faz o comportamento antenar em direção ao indivíduo observado.
11. Morder (M): quando o indivíduo observado morde outra fêmea em alguma parte do corpo com as mandíbulas.

12. Sendo mordida (SM): quando o indivíduo observado é mordido por outro indivíduo.
13. Recebe “*worker dance*” (RWD): comportamento característico das operárias para as rainhas. Durante o “*worker dance*” as operárias vibram o corpo e as asas, e roçam as antenas rapidamente em direção à rainha (West-Eberhard, 1978).
14. “*Bending display*” (BD): a rainha curva o abdômen em direção a outro indivíduo. Este comportamento é feito de duas formas: *bending display* tipo I (BD1) ocorre quando uma rainha parada curva o abdômen para outro indivíduo (rainha ou operária) e este indivíduo pode responder ou não. O *bending display* tipo II (BD2) é um tipo de interação entre duas rainhas que inclui o *bending display*. Ocorre quando uma rainha curvar o abdômen para outra rainha, mas esta não fica parada, e também realiza outros comportamentos simultaneamente como: abrir as asas, aproximar a cabeça, virar a posição do corpo, investir e balançar o corpo. Adicionalmente, quando a rainha realiza o *bending display* tipo II (BD2) para outra rainha esta responde diante do estímulo com submissão (regurgitando líquidos ou fugindo), fazendo o *bending display*, ou pode não responder (West-Eberhard, 1978).
15. Receber *bending display* tipo I (RBD1): um determinado indivíduo faz o *bending display* tipo I direção do indivíduo observado.
16. Agrupar (Group): rainhas observadas em grupo muito próximas entre elas movendo o corpo uma contra outra e empurrando levemente aquela que estava do lado. O *bending display* I pode ser feito quando as rainhas estão dentro do grupo.
17. Desviar (Dv): quando um indivíduo caminha em direção do indivíduo observado, e ao chegar perto vira o corpo imediatamente e caminha em outra direção. Também foi observado quando um indivíduo recebeu um comportamento e sua resposta foi ir embora.
18. Causar desvio (SDv): quando um indivíduo causa o desvio de outro.

19. Trofalaxia (Tx): o indivíduo, segundo Mateus (2005), introduz a glossa entre as mandíbulas de outro indivíduo (rainha ou operária) que expõe uma gota de líquido. Também movimenta o primeiro par de pernas durante o intercâmbio de líquido.
20. Auto Limpeza (Limp): o indivíduo esfrega as pernas anteriores contra a cabeça e antenas, ou as pernas posteriores contra o abdômen e asas e as pernas posteriores abaixo do abdômen.
21. Solicitar (Solc): quando o indivíduo observado aproxima suas mandíbulas com as mandíbulas de outro tentando fazer trofalaxia ou solicitando material.
22. Construção do envelope (CE): indivíduo adiciona polpa macerada na borda do invólucro.
23. Aumentar célula (AC): adicionar polpa macerada na borda da célula.
24. Revestir célula (RC): quando uma operária adiciona secreções nas paredes ou sobre o casulo da larva na célula.
25. Dividir material (DivM): quando o indivíduo observado aproxima-se para dividir a massa de polpa ou o líquido, com outro (s) indivíduo (s) da colônia.
26. Receber material (Rmat): o indivíduo observado recebe parte da massa de polpa de outro indivíduo.
27. Macerar (Mc): quando um indivíduo trabalha a polpa com as mandíbulas e o primeiro par de pernas, adicionando saliva no material que é utilizado na construção ou alimentação das larvas (Mateus, 2005).
28. Forragear (Forrg): quando um indivíduo chega ao ninho carregando material sólido ou líquido.

A frequência dos comportamentos foi contabilizada individualmente para cada fêmea, para determinar diferenças entre as fases do ciclo colonial. Foram anotados o

tipo de comportamento realizado, a duração total, qual fêmea iniciava o ato comportamental, o possível estímulo que motivou o ato, e a resposta do indivíduo que recebia o comportamento. As frequências foram analisadas por meio de teste qui-quadrado. Entretanto, quando os valores esperados foram menores que cinco o teste G foi utilizado para realizar as análises. Para determinar se as rainhas fizeram os comportamentos de *display* com maior frequência com as operárias ou com outras rainhas dentro de cada colônia estudada, a frequência total dos comportamentos foi analisada por meio de teste qui-quadrado. Para determinar se a frequência total dos comportamentos de *display* foi maior antes ou depois da seleção, e antes e depois da eliminação das rainhas as frequências também foram analisadas por teste meio de teste qui-quadrado. Nestes casos, a frequência foi corrigida pelo tempo total de observação para cada semana e pela quantidade total de rainhas observadas. Isto porque a frequência podia ser resultado da maior quantidade de rainhas observadas ou do tempo de observação que foi menor (ou maior) em algumas semanas. Para determinar se a frequência dos comportamentos de *display* feitos e recebidos pelas rainhas das colônias Mt-2 de *M. miltoni* e Cg-3 de *C. golfitensis* era diferente entre os indivíduos, a frequência semanal com que cada rainha marcada fez um determinado comportamento foi analisada por meio do teste ANOVA de Friedman. Neste caso, a frequência foi corrigida pelo tempo total de observação em cada semana para cada indivíduo. As análises foram realizadas no programa STATISTICA 7.0.

Otimização filogenética de caracteres comportamentais

Os comportamentos de *display* relacionados ao processo de seleção e eliminação de rainhas, alguns dos comportamentos característicos e não característicos das rainhas, assim como a resposta das rainhas ante alguns comportamentos, foram

analisados através da otimização direta (Amorim, 2002) combinando os dados referentes aos comportamentos com aqueles utilizados para gerar a filogenia mais aceita atualmente para os Epiponini (Wenzel, Carpenter, 1994). A análise filogenética foi feita em relação com a metodologia desenvolvida por Hennig (1966), complementada por outras metodologias desenvolvidas recentemente (Scotland, Pennington, 2000; Schuh, 2000; Amorim, 2002). Também seguimos os critérios de Remane na análise preliminar de dados comportamentais para calcular a inferência na ocorrência de homologias (Wenzel, 1992). A matriz de dados foi construída no programa Winclada 1.7 (Nixon, 1999). As análises foram feitas no programa TnT 1.1 (Goloboff et al., 2008). Em todos os casos os caracteres foram tratados como não aditivos, não impondo previamente qualquer premissa sobre possibilidade de transformação entre os estados. Foi realizada uma busca heurística no TnT 1.1, utilizando o algoritmo RAS + TBR (random addition sequences + tree bisection-reconnection) que adiciona sequências aleatoriamente e, quando as árvores são obtidas, ocorre uma quebra na árvore e os ramos obtidos são combinados até que se encontre uma árvore mais parcimoniosa, que será mantida e assim sucessivamente.

Como mencionado acima, os táxons escolhidos correspondem aos principais ramos da filogenia dos Epiponini, sobretudo aqueles que se originaram do plano básico “sem castas” (Noll, Wenzel, 2008). Os táxons mais basais não serão avaliados neste estudo, mas conseguimos obter alguns dados de *Agelaia* através dos estudos de Simões (1977). Os dados obtidos das nove espécies estudadas (*Metapolybia miltoni*, *Metapolybia servilis*, *Chartergellus communis*, *Chartergellus golfitensis*, *Protopolybia exigua*, *Protopolybia picteti*, *Polybia selvana*, *Polybia occidentalis*, *Brachygastra smithii*) foram associados aos dados comportamentais obtidos da literatura (*Protopolybia*: Naumann, 1970; *Polybia occidentalis*: Forsyth, 1978; *Agelaia pallipes*: Simões, 1977; *Asteloeca ujhelyii*: Nascimento et al., 2004; *Parachartergus fraternus*: Mateus, 2005) e

das informações oferecidas por parte de pesquisadores (*Asteloeca ujhelyii*: Fábio Nascimento; *Parachartergus fraternus* e *Parachartergus smithii*: Sidnei Mateus, e *Synoeca surinama*: Carlos Alberto dos Santos), para compor a matriz de caracteres.

Para estudar a evolução dos comportamentos relacionados com o processo de seleção e eliminação de rainhas, utilizamos os comportamentos de *bending display* I e II (BD1 e BD2), *worker dance* (WD), investir (Inv), morder (M) e *group*. Interpretamos evolutivamente a presença e ausência dos comportamentos entre as espécies, assim como a resposta dos indivíduos ante os comportamentos de teste. Para entender as mudanças na quantidade de fêmeas reprodutoras durante o processo de seleção entre os clados, interpretamos evolutivamente a variação no número de rainhas e de fêmeas que faziam os comportamentos de *display* em diferentes fases do ciclo. Os caracteres empregados na análise serão explicados a seguir:

1. BD1/R-O= quando a(s) rainha(s) foi observada(s) fazendo o *bending display* tipo I para as operárias.
2. BD1/R-R= quando a(s) rainha(s) foi observada(s) fazendo o *bending display* tipo I para outras rainhas.
3. BD1/Op= as operárias foram observadas fazendo o *bending display* tipo I para outras operárias.
4. BD1/O-R= as operárias foram observadas fazendo o *bending display* tipo I para as rainhas.
5. BD2/R-R= quando uma rainha faz o *bending display* tipo II para outra rainha.
6. Inv/R-O= quando a(s) rainha(s) foi observada(s) investindo contra uma operária.
7. Inv/R-R= quando a(s) rainha(s) foi observada(s) investindo contra outra rainha.
8. Inv/O-R= quando as operárias foram observadas investindo contra uma rainha.
9. RWD/O-R= as operárias foram observadas fazendo o *worker dance* para as rainhas.
10. M/O-R= as operária foram observadas mordendo as rainhas.
11. M/R-R= as rainhas foram observadas mordendo outras rainhas.
12. M/R-O= as rainhas foram observadas mordendo as operárias.
13. Group= as rainhas são observadas fazendo o comportamento *group*.

14. Rm= quando as fêmeas da colônia foram observadas removendo à rainha da célula (ver descrição dos comportamentos).

15. LOv= quando as fêmeas da colônia foram observadas lambendo o ovo que outro indivíduo botou.

16. TrabRain= se as rainhas foram observadas fazendo trabalhos de operárias.

17. FTOVC= quando outras fêmeas (operárias ou intermediárias) foram observadas tentando botar ovos durante diferentes fases do ciclo colonial.

18. FTOVFS= quando outras fêmeas (operárias ou intermediárias) foram observadas tentando botar ovos, mas somente durante a fase de seleção ou eliminação de rainhas.

19. AQRFDp= Após a eliminação da rainha “original”, foi observado um aumento da quantidade de fêmeas que fizeram comportamentos de *displays*.

20. AQRBOv= Após a eliminação da rainha “original”, foi observado um aumento da quantidade de fêmeas que botavam ovos.

21. AFBD= Após a eliminação da rainha “original”, foi observado um aumento na frequência do *bending display*.

22. RBD1-R/NR= se foram observadas rainhas recebendo o *bending display* I de outra rainha, mas não responderam.

23. RBD1-R/DV= se foram observadas rainhas recebendo o *bending display* I de outra rainha, e responderam desviando.

24. RBD1-R/BD= se foram observadas rainhas recebendo o *bending display* I de outra rainha, e responderam com *bending display* I.

25. RBD1-R/ANT= se foram observadas rainhas recebendo o *bending display* I de outra rainha, e responderam com antenação.

26. RBD1-R/RGLQ= se foram observadas rainhas recebendo o *bending display* I de outra rainha, e responderam regurgitando líquido.

27. RBD1-O/NR= se foram observadas rainhas recebendo o *bending display* I de uma operária, mas não responderam.

28. RBD1-O/DV= se foram observadas rainhas recebendo o *bending display* I de uma operária, e responderam desviando.

29. RBD1-O/BD= se foram observadas rainhas recebendo o *bending display* I de uma operária, e responderam com *bending display* I.

30. RWD/NR= se foram observadas rainhas recebendo o *worker dance* de operárias, mas não responderam.

31. RWD/DV= se foram observadas rainhas recebendo o *worker dance* de operárias, e responderam desviando.

32. RWD/BD= se foram observadas rainhas recebendo o *worker dance* de operárias, e responderam com *bending display I*.

33. RWD/ANT= se foram observadas rainhas recebendo o *worker dance* de operárias, e responderam antenando.

34. RWD/RGLQ= se foram observadas rainhas recebendo o *worker dance* de uma operária, e responderam regurgitando líquido.

35. RWD/LA= se foram observadas rainhas recebendo o *worker dance* de uma operária, e responderam levantando o abdômen.

36. INV.R-O/NR= se foram observadas rainhas investindo (Inv) as operárias mas elas não responderam.

37. INV.R-O/DV= se foram observadas rainhas investindo (Inv) as operárias e elas responderam desviando.

38. INV.R-O/BD= se foram observadas rainhas investindo (Inv) as operárias e elas responderam com *bending display I*.

39. INV.R-O/RGLQ= se foram observadas rainhas investindo (Inv) as operárias e elas responderam regurgitando líquido.

40. INV.R-R/NR= se foram observadas rainhas investindo (Inv) outras rainhas e ela não responderam.

41. INV.R-R/DV= se foram observadas rainhas investindo (Inv) outras rainhas e ela responderam desviando.

42. INV.R-R/BD= se foram observadas rainhas investindo (Inv) outras rainhas e ela responderam com *bending display I*.

43. INV.R-R/ANT= se foram observadas rainhas investindo (Inv) outras rainhas e ela responderam antenando.

44. INV.O-R/NR= se foram observadas operárias investindo (Inv) rainhas mas elas não responde.

45. INV.O-R/DV= se foram observadas operárias investindo (Inv) rainhas e elas responderam desviando.

46. INV.O-R/BD= se foram observadas operárias investindo (Inv) rainhas e elas responderam com *bending display I*.

47. INV.O-R/ANT= se foram observadas operárias investindo (Inv) rainhas e elas responderam antenando.

48. INV.O-R/INV= se foram observadas operárias investindo (Inv) rainhas e elas responderam investindo.

49. M.O-R/DV= se foram observadas operárias mordendo as rainhas e elas responderam desviando.

50. M.O-R/BD= se foram observadas operárias mordendo as rainhas e elas responderam com *bending display* I.

51. M.O-R/BD= se foram observadas operárias mordendo as rainhas e elas responderam com *bending display* I.

Desenvolvimento de ovários e idade das fêmeas

Após de realizar as observações, um ninho de cada gênero foi coletado para determinar os conteúdos das células, o tamanho da população, o estado de desenvolvimento dos ovários e a idade relativa das fêmeas. Por outro lado, nas colônias onde a população não foi coletada, uma amostra incluindo todas as fêmeas marcadas foi coletada para análise. As fêmeas dissecadas foram classificadas em relação ao desenvolvimento dos ovários e o conteúdo da espermateca. A presença de células na espermateca foi detectada por observação sob o microscópio. Foram feitas seis categorias para o grau de desenvolvimento dos ovários nas colônias estudadas (Fig. 6):

- fêmeas tipo O1: apresentam ovários filamentosos não desenvolvidos e sem oócitos visíveis,
- fêmeas tipo O2: apresentam ovários filamentosos com oócitos imaturos muito pequenos,
- fêmeas tipo O3: apresentam ovários com início de desenvolvimento de oócitos pequenos bem definidos,
- fêmeas tipo O4: apresentam ovários com um ou dois oócitos quase maduros na base do ovário,

- fêmeas tipo O5: apresentam ovários com um ou quatro oócitos maduros preparados para oviposição na base do ovário,
- fêmeas tipo O6: apresentam ovários com oócitos grandes e bem desenvolvidos.

As fêmeas de *Metapolybia miltoni* do ninho Mt-1 apresentaram três tipos de ovário: O1, O2 (operárias) e O6 (rainhas) (Fig. 6). As fêmeas de *M. servilis* apresentaram quatro tipos de ovário: O1, O2 (operárias), O4 e O6 (rainhas) (Fig. 6). Finalmente as fêmeas de *Chartergellus* apresentaram todos os tipos de ovários: O1, O2, O3, O4, O5 e O6 (Fig. 6), as fêmeas com ovários tipo O1, O2, O3 e O4 foram classificadas como operárias, as fêmeas com ovários O5 sem esperma na espermateca como intermediárias, e as fêmeas com ovários tipo O5 e O6 com esperma na espermateca foram classificadas como rainhas. As fêmeas de *Protopolybia* apresentaram cinco categorias de desenvolvimento de ovários: O1, O2, O4, O5 e O6 (Fig. 6). A classificação das fêmeas em relação com o grau de desenvolvimento dos ovários é complicada no caso de *Protopolybia*; segundo a classificação feita em outros estudos (Noll et al., 1996; Noll, Zucchi, 2002; Noll et al., 2004) as operárias seriam as fêmeas com ovários tipo O1, O2 e O4, as intermediárias tipo O5, e as rainhas tipo O6. Em outros estudos é difícil saber qual era o tipo de ovário que apresentavam as intermediárias, uma vez que os pesquisadores não mencionam como foi feita a classificação (Gastreich et al., 1996; Mateus et al., 1997).

Figura 6. Categorias do grau de desenvolvimento dos ovários para as fêmeas das colônias estudadas. Desenho modificado de Noll et al., (1996), Baio et al., (2002), Mateus et al., (1997) e Mateus et al., (2004). Escala 1mm.

No caso das espécies de *Protopolybia* estudadas foram encontradas fêmeas reprodutoras (esperma na espermateca) com ovários tipo O2, O4 e O5, como estas fêmeas foram encontradas após a eliminação das rainhas originais, é provável que fossem intermediárias. Este resultado mostra que as intermediárias não necessariamente tinham ovários tipo O5. Semelhante, Mateus et al. (2004) encontraram que as intermediárias podiam apresentar quatro tipos ovários diferente. Por este motivo, pensamos que a classificação feita por Mateus et al. (2004) é a que melhor caracteriza as castas morfológicamente, por tanto as fêmeas com ovários O1 foram classificadas como operárias, no entanto as fêmeas com ovários O2, O4 e O5 podiam ser intermediárias ou rainhas (dependendo do conteúdo da espermateca), e as fêmeas com ovários O6 eram rainhas. É importante lembrar que esta é uma classificação feita em relação ao grau de desenvolvimento dos ovários, uma vez que, como será explicado em “Resultados e Discussão”, as intermediárias pelo comportamento são classificadas como operárias e não como rainhas. Os resultados sobre desenvolvimento de ovários serão melhor detalhados na seção “Seleção e Totipotência das rainhas”.

Para determinar a idade relativa das fêmeas foi utilizada a análise de coloração progressiva do apódema transversal (localizado na base superior dos esternitos). Segundo Richards (1971) e West-Eberhard (1973) a pigmentação progressiva dessas estruturas está relacionada à idade relativa dos indivíduos adultos. Foram determinadas cinco categorias de idade: amarelo claro (Am) para as fêmeas mais novas, marrom claro (MC), marrom (M), preto linha delgada (PL), e preto linha grossa (PG) para as fêmeas mais velhas (Fig. 7).

Figura 7. Categorias crescentes de idade feitas para as fêmeas de *Metapolybia*, *Protopolybia* e *Chartergellus*. Amarelo claro (Am) para as fêmeas mais novas, marrom claro (MC), marrom (M), preto linha delgada (PL), e preto linha grossa (PG) para as fêmeas mais velhas.

Resultados e Discussão

A- CONTEÚDO DOS NINHOS, POPULAÇÃO E CICLO COLONIAL

Ninho Mt-1 de Metapolybia miltoni

Provavelmente quando começaram as observações o ninho se encontrava numa fase matura de produção de novos indivíduos, porque a colônia tinha uma grande quantidade de pupas e menos larvas e ovos. Durante as semanas seguintes a quantidade de pupas foi diminuindo, mas a colônia continuou crescendo (Tabela 2).

Tabela 2. Fase do ciclo colonial e quantidade de imaturos do ninho Mt-1 de *Metapolybia miltoni* observado em Fronteira, MG.

Semana	Fase do ciclo	Ovos	Larvas	Pupas
Novembro I	Matura	10%	10%	80%
Novembro II	Matura, produção de adultos	40%	10%	40%
Novembro IV	Crescimento	40%	55%	5%
Novembro V	Crescimento	40%	55%	5%
Dezembro I	Crescimento	45%	45%	10%

A colônia era formada por 188 indivíduos: 156 operárias (83%) e 32 rainhas (17%). A maior parte das rainhas e operárias foi classificada como velhas (66%) pela pigmentação escura do esternito (PL e PG), 21% era de indivíduos novos (Am e MC) e

13% era de idade intermediária (M) (Fig. 7). Também foram encontradas quatro fêmeas com os ovários desenvolvidos, mas com a espermateca vazia (intermediárias), sendo que três eram velhas (duas PG e uma PL) e uma era jovem (MC).

A presença de intermediárias (fêmeas com ovários desenvolvidos, mas com a espermateca vazia) não é comum dentro do gênero *Metapolybia*. Por exemplo, nos estudos realizados anteriormente (West-Eberhard, 1978; Baio et al., 2003; Noll et al., 2004; Chavarría, 2009) nunca foram reportadas intermediárias dentro das colônias estudadas. Mesmo assim, dentro do ninho estudado o número destas fêmeas foi reduzido, por este motivo pensamos que as fêmeas encontradas não eram intermediárias, mas umas poucas operárias (N=3) e uma fêmea jovem (MC) tentando atingir o status de rainha. O fato de a colônia ter várias rainhas (N=32) mostra que o ninho estava passando por uma etapa de poliginia e, como consequência, algumas operárias poderiam estar tentando estabelecer-se como rainhas durante este período de tolerância, o que poderia explicar a presença de fêmeas com ovários desenvolvidos e espermateca vazia.

A colônia possivelmente estava em uma etapa de produção de novos indivíduos, porque foram produzidas pelo menos duas gerações de adultos durante o período de observação. Entretanto, parece que a colônia não estava passando por um processo de crescimento mas sim de reprodução, uma vez que foram encontrados poucos indivíduos jovens no momento da coleta. Possivelmente alguns dos indivíduos jovens estavam migrando do ninho para formar novas colônias (West-Eberhard, 1982). É possível que a colônia estivesse produzindo novas rainhas. Como explicado anteriormente, as rainhas velhas sempre serão selecionadas em detrimento das novas (Strassmann et al., 2002), ou seja, possivelmente dentro da colônia estudada as novas rainhas não estavam sendo favorecidas para reprodução, e por este motivo algumas fêmeas jovens migraram do ninho, e por causa disto a população era formada por fêmeas velhas principalmente.

Ninho Mt-2 de Metapolybia miltoni

As observações da colônia localizada na USP de Ribeirão Preto começaram provavelmente um pouco tempo depois da fundação do ninho, porque durante a primeira semana de observações havia algumas células com ovos e larvas muito pequenas, mas também células vazias, de modo que o ninho deveria estar numa fase inicial de estabelecimento. Durante a primeira semana somente três fêmeas foram observadas botando ovos. Durante a quinta semana de observações a colônia entrou numa fase de crescimento e produção de adultos (Tabela 3). Novas fêmeas reprodutoras foram marcadas nas semanas seguintes (Outubro até Novembro IV) um vez que botaram ovos. Entretanto, a quantidade de novas fêmeas reprodutivas foi diminuindo até a sétima semana quando não foram marcadas mais fêmeas botando ovos (Tabela 3). No total foram marcadas 19 fêmeas reprodutoras.

Durante a segunda fase de observações (de 31/01 até 23/02) os indivíduos aumentaram o tamanho do ninho e adicionaram uma maior quantidade de células na parte inferior. Possivelmente o ninho entrou em uma nova fase de crescimento (Tabela 3). Somente seis das 19 fêmeas reprodutoras marcadas na primeira fase foram observadas. Durante a décima semana as fêmeas reprodutoras foram retiradas para se realizar o teste de remoção. Durante a última semana de observações o número de células com pupas aumentou, provavelmente a colônia entraria de novo em um período de produção de indivíduos (Tabela 3).

A colônia N-2 de *M. miltoni* não foi coletada. Como mencionado anteriormente, somente uma colônia de cada gênero seria coletada para análise da população. Mesmo assim, decidimos não coletar este ninho para não ter um impacto maior sobre a população de *M. miltoni* na USP, uma vez que a quantidade de ninhos dentro do campus é muito reduzida. Contudo, as cinco fêmeas reprodutoras marcadas foram

coletadas e determinamos que todas eram rainhas porque tinham ovários desenvolvidos (O6) (Fig. 6) e esperma na espermateca; todas as fêmeas eram indivíduos velhos (PG) (Fig. 7).

Tabela 3. Fase do ciclo colonial e conteúdo do ninho Mt-2 de *Metapolybia miltoni* observado na USP em Ribeirão Preto.

Semana	Novas rainhas	Total rainhas	Fase do ciclo	Ovos	Larvas	Pupas
Setembro	3	3	Estabelecimento	5%	5%	0%
Outubro	2	5	Estabelecimento	5%	30%	0%
Novembro I	7	12	Estabelecimento	5%	10%	20%
Novembro II	5	17	Estabelecimento	5%	10%	40%
Novembro III	1	18	Matura produção de adultos	5%	10%	20%
Novembro IV	1	20	Matura produção de adultos	40%	10%	40%
Dezembro I	0	20	Matura produção de adultos	40%	10%	20%
Janeiro I	0	6	Matura crescimento	60%	10%	10%
Fevereiro I	0	6	Matura crescimento	60%	10%	10%
Fevereiro II	Eliminação rainhas	0	Matura crescimento	40%	40%	20%
Fevereiro III	0	0	Matura crescimento	40%	40%	20%
Fevereiro III	6	6	Matura crescimento	20%	20%	60%

Ninhos Mt-3A e Mt-3B de Metapolybia servilis

Possivelmente quando começaram as observações em Abril de 2011, a colônia (Mt-3A) já havia produzido pelo menos uma geração de adultos, uma vez que algumas das células estavam sendo reutilizadas. Durante as duas primeiras semanas a colônia estava passando por uma fase matura de produção de adultos, uma vez que o ninho tinha uma grande quantidade de pupas (Tabela 4). Seis fêmeas foram observadas botando ovos durante esta semana. Durante a terceira semana as seis rainhas foram

removidas. A colônia entrou numa etapa de crescimento porque muitas das células que continham pupas foram substituídas por ovos (Tabela 4).

O ninho tinha aumentado de tamanho quando começaram as observações em Fevereiro de 2012 (Mt-3B). A colônia estava passando por uma etapa de crescimento, uma vez que todas as células tinham conteúdo (Tabela 4). As rainhas foram eliminadas durante a primeira semana de observações, mesmo assim não foram observadas muitas fêmeas tentando atingir o status de rainha em relação ao ano 2011. Como as rainhas estavam sendo observadas com pouca frequência na parte aberta do envelope, mais uma remoção foi feita nove semanas depois da primeira remoção, para estimular a produção de novas rainhas e o processo de seleção. Entretanto, a segunda remoção estimulou um enxame de fuga, e toda a população do ninho deslocou-se. É provável que as manipulações afetaram o comportamento dos indivíduos em 2012 mais que em 2011, pois como foi mencionado as rainhas foram observadas com pouca frequência. Possivelmente as manipulações junto com a eliminação das rainhas provocaram o enxame da população.

Tabela 4. Fase do ciclo colonial e conteúdo do ninho Mt-3 de *Metapolybia servilis* observado no RVSG em Golfito, Costa Rica.

Semana	Novas rainhas	Total rainhas	Fase do ciclo	Ovos	Larvas	Pupas
Abril II/11	6	6	Matura produção de adultos	25%	25%	50%
Abril III/11	0	6	Matura produção de adultos	10%	10%	80%
Abril IV/11	Eliminação de rainhas	0	Matura crescimento	60%	10%	30%
Maio I/11	8	8	Matura crescimento	80%	15%	5%
Maio II/11	8	16	Matura crescimento	80%	15%	5%
Maio III/11	2	18	Matura crescimento	80%	20%	0%
Maio IV/11	1	19	Matura crescimento	80%	20%	0%
Fevereiro/12	Eliminação de rainhas	12	Matura crescimento	10%	50%	40%
Março/12	7	7	Matura crescimento	30%	30%	40%

Abril I/12	1	8	Matura crescimento	5%	25%	70%
Abril II/12	1	9	Matura crescimento	20%	10%	70%
Maio I/12	Eliminação de rainhas	0	Matura produção de adultos	55%	5%	40%
Maio II/12	1		Enxame			

Ninho Pp-1 de Protopolybia picteti

O ninho de *Protopolybia picteti* estudado era formado por quatro favos (Fig. 4). No entanto, as observações foram feitas utilizando somente os últimos dois favos da parte inferior (favos 3 e 4), uma vez que ao estarem unidos entre si, a observação dos favos superiores era limitada. Também se o envelope era retirado dos favos anteriores, a estrutura do ninho poderia ter colapsado, posto que o envelope serve como suporte para os favos. Isto poderia ter gerado um enxame de fuga, com o risco de se perder a população.

Possivelmente quando começaram as observações, a colônia tinha produzido ao menos uma geração de adultos, uma vez que os favos feitos mais recentemente (parte inferior) tinham algumas pupas. A colônia estava numa fase produção de adultos (Tabela 5). Durante a primeira semana, 17 fêmeas foram observadas em posição de ovipositar, embora algumas destas fêmeas possivelmente fossem operárias uma vez que após inspecionar a célula não foi observado ovo, e foram observados fazendo comportamentos característicos de operárias. Das 17 fêmeas marcadas somente cinco botaram ovos e foram observadas fazendo comportamentos de rainhas. Durante a segunda semana de observações foram observados machos dentro da colônia. Somente duas rainhas e 12 intermediárias foram marcadas durante esta semana. Durante a terceira semana as rainhas “originais” foram eliminadas e uma maior quantidade de machos foi observada, o que gerou comportamentos agressivos por parte das operárias sobre estes. Durante o segundo dia de observações da sétima

semana, as novas rainhas e algumas intermediárias foram coletadas quando se encerraram as observações.

Tabela 5. Fase do ciclo colonial e conteúdo do ninho Pp-1 de *Protopolybia picteti* observado no RVSG em Golfito, Costa Rica.

Semana	Novas rainhas	Total rainhas	Fase do ciclo	Ovos	Larvas	Pupas
Abril II	5	5	Matura produção de adultos (machos)	20%	20%	60%
Abril III	2	7	Matura produção de adultos (machos)	40%	20%	40%
Abril IV	Eliminação de rainhas	0	Matura produção de adultos (machos)	40%	20%	40%
Maio I	4	4	Matura produção de adultos (machos)	30%	10%	60%
Maio II	1	5	Matura produção de adultos (machos)	20%	10%	70%
Maio III	0	5	Matura produção de adultos (machos)	20%	10%	70%
Maio IV	1	6	Matura produção de adultos (machos)	20%	10%	70%

Ninho Pe-2 de Protopolybia exigua

Quando começaram as observações a colônia estava numa fase de estabelecimento, uma vez que o ninho era formado somente por um favo e sem envelope. Mesmo assim a colônia foi crescendo muito rápido e, quinze dias após, o ninho tinha envelope e mais um favo estava sendo construído. Como os novos favos em *Protopolybia* são construídos por cima do envelope as observações foram feitas somente no favo mais externo para não colapsar a estrutura do ninho. Pela posição em que o ninho estava foi difícil contabilizar o conteúdo das células do favo observado. Durante a terceira semana de observações parte do envelope do favo F2 e mais um favo (F3) foram construídos e nenhuma pupa foi observada. Durante a quarta, quinta e sexta semana o favo F3 aumentou de tamanho. Durante a sexta semana machos foram observados dentro do ninho; a quantidade machos continuou aumentando durante as

semanas seguintes. Durante a sétima semana pupas foram observadas no favo F3 e as operárias iniciaram a construção do novo envelope. Durante a oitava e nona semanas a quantidade de pupas aumentou em aproximadamente 70%, apesar de durante a nona semana a quantidade de adultos começar a diminuir.

Durante a décima semana a quantidade de pupas diminuiu até 10% do total anterior, indicando que novos indivíduos tinham emergido. Mesmo assim, a quantidade de adultos continuou diminuindo, e as operárias foram observadas removendo larvas e pupas das células. A quantidade de adultos continuou diminuindo durante as semanas seguintes, e por este motivo a colônia foi coletada durante a 13ª semana, uma vez que o comportamento dos indivíduos indicava que a colônia poderia enxamear. Possivelmente a infestação da colônia por moscas da família Phoridae estimulou a enxamear. Segundo Simões (1977) e Simões et al. (1996) a infestação por moscas Phoridae é uma das principais causas de abandono de ninhos.

Como mencionado anteriormente a colônia foi coletada para estudo da população, e no total foram coletados 189 indivíduos: 82% operárias (N=155), 13% machos (N=25), 5% rainhas (N=9). O conteúdo da espermateca, desenvolvimento de ovários e idade não foram estudados para 49 fêmeas da população, uma vez que os indivíduos não estavam bem conservados no álcool. Todas as rainhas coletadas eram velhas (PL, PG) (Fig. 10), e todas, com exceção de um indivíduo (O5), tinham ovários tipo O6. Somente quatro indivíduos foram classificados como intermediárias, uma vez que apresentavam ovários desenvolvidos (O5), mas a espermateca vazia. A maior parte das operárias coletadas apresentava ovários tipo O1 (65%) e eram velhas (PG= 73% PL= 16%). O resto tinha ovários tipo O2 (12%) e O4 (23%), poucas operárias jovens (5%) e de idade média (6%) foram encontrados no momento da coleta. Semelhante ao observado no ninho Mt-1 de *M. miltoni*, pode ser que alguns dos indivíduos jovens migraram do ninho para formar novas colônias, e por causa disto a baixa proporção

encontrada na população. A maior parte dos machos coletados era de indivíduos jovens (AM e MC) e de idade média (M), somente um macho era velho (PL).

Ninho Pe-3 e Ninho Pe-4 de *Protopolybia exigua*

O ninho Pe-3 de *P. exigua* não mudou muito durante as seis semanas de observação. Quando começaram as observações, o ninho era formado por um favo e algumas células tinham ovos (40%). Somente uma fêmea foi observada agindo como rainha e recebendo o *worker dance* por parte das operárias, embora outras fêmeas fossem observadas inserindo o abdômen nas células. Durante a terceira semana foram observadas pupas (5%), mas sua quantidade não aumentou durante as semanas seguintes; pelo contrário, diminuiu. A única rainha que botou ovos não foi observada novamente no ninho após a quarta semana. Na quinta semana todas as larvas e pupas tinham desaparecido do ninho. Aparentemente as operárias comeram os conteúdos das células. Este comportamento ocorre quando uma colônia está prestes a enxamear. Menos adultos foram observados durante a quinta e sexta semana, até que durante a sétima semana a colônia enxameou.

A colônia Pe-4 de *P. exigua*, também enxameou mas foi encontrada. Durante a primeira semana de observações, aproximadamente 55% das células tinham ovos, 40% larvas e 5% pupas. Quatro fêmeas foram observadas botando ovos durante esta semana. Durante a semana seguinte a quantidade de adultos dentro do ninho diminuiu, e várias pupas e larvas foram removidas das células. Durante a terceira semana a colônia enxameou, mas foi encontrada em outro local próximo do ninho inicial. Até a quinta semana foram observadas larvas de tamanho maior, e começou a construção de um novo envelope pelas operárias. Entretanto, durante a sexta semana o indivíduos enxamearam novamente, e restaram umas poucas fêmeas que foram coletadas na

semana seguinte. Foram coletadas onze fêmeas marcadas, sendo seis rainhas: três com ovários tipo O4, duas tipo O5 e uma tipo O6, todas eram indivíduos de idade intermediária com exceção de uma que era velha (PL). As cinco fêmeas restantes não tinham a espermateca inseminada, e estes indivíduos foram marcados porque foram observados em posição de botar com o abdômen inserido na célula. Quatro tinham ovários tipo O4 e uma tipo O2, todos eram indivíduos velhos (PL= 2, PG=3).

Ninho Cc-1 de *Chartergellus communis*

Durante a primeira semana, quando o envelope foi removido do ninho, a colônia era constituída por muitos indivíduos, tantos que podia ser observado um grupo ocioso no canto esquerdo do ninho. Muitas células não tinham conteúdo, e o resto continha principalmente ovos e larvas muito pequenas. Portanto, quando iniciaram as observações, a colônia possivelmente estava numa fase inicial de estabelecimento. Durante a segunda semana de observações a quantidade de indivíduos dentro do ninho tinha diminuído bastante. Evidentemente, uma parte da população tinha migrado. Possivelmente alguns indivíduos migraram por causa das manipulações que foram feitas, ou alguns adultos saíram para fundar uma nova colônia. Dentro das células foram observadas larvas em estado de desenvolvimento mais avançado e algumas células com pupas. Durante as semanas seguintes, a colônia continuou crescendo, novos indivíduos emergiram (Tabela 6), novas células foram adicionadas aos favos, e novos favos foram construídos. Durante a décima sétima semana de observações (Outubro II) a única rainha do ninho foi removida.

O ninho de *C. communis* era formado por 11 favos, sendo o conteúdo de cada favo resumido na Tabela 7. Como foi mencionado anteriormente, a quantidade de células e o número de favos aumentaram desde o primeiro dia de observações até o dia

da coleta. Foram coletados 301 adultos. Mesmo não sendo encontrados machos dentro da população, eles foram observados fora do ninho após a eliminação da rainha. Uma amostra de três machos foi coletada.

A colônia era formada por 298 indivíduos: 280 operárias (93,9%), 16 rainhas (5,4%) e duas intermediárias (0,67%). A maior parte das operárias (N=111) apresentava idade intermediária (M), mas também foram encontradas operárias velhas (PL= 96, PG= 73). As rainhas também eram de idades intermediárias (M=7) e velhas (PL=8), à exceção da rainha original (R3) que era de idade mais avançada (PG). Uma intermediária era de idade intermediária (M), e outra era velha (PL). Não foram encontrados indivíduos novos dentro da população, mesmo quando a colônia estava passando por uma fase de produção de novos indivíduos. Possivelmente alguns indivíduos jovens estariam migrando, similar ao observado para as colônias Mt-1 de *M. miltoni* e Pe-2 de *P. exigua*.

Tabela 6. Fase do ciclo colonial e conteúdo do ninho Cc-1 de *Chartergellus communis* observado em Pedregulho (SP).

Semana	Novas rainhas	Total rainhas	Fase do ciclo	Ovos	Larvas	Pupas
Maio I e II	11	11	Estabelecimento	20%	10%	0%
Maio III	0	4	Estabelecimento	40%	30%	30%
Maio IV, Junho I	0	4	Produção de adultos	35%	40%	25%
Junho II, III, IV	0	1	Matura produção de adultos	30%	20%	50%
Julho I, II, III, IV	0	1	Produção de adultos e crescimento	40%	20%	40%
Setembro I, II	0	1	Produção de adultos e crescimento	40%	30%	30%
Setembro III, Outubro I	0	1	Produção de adultos e crescimento	20%	10%	70%
Outubro II, III	Eliminação da rainha	0	Produção de adultos e crescimento	10%	10%	80%
Novembro I, II	10	10	Produção de adultos e crescimento	40%	20%	30%

Tabela 7. Conteúdo dos favos da colônia Cc-1 de *Chartergellus communis* em Pedregulho (SP).

Favo	Células Ovos	Células Larvas	Células Pupas	Células vazias	Total
1	61	78	64	4	207
2	52	70	65	3	190
3	51	30	24	2	107
4	15	23	14	3	55
5	7	11	27	0	45
6	24	15	9	1	49
7	3	9	5	0	17
8	22	0	0	0	22
9	6	2	2	0	10
10	7	9	1	3	20
11	7	6	3	2	18
Total	255	253	214	18	740

Ninho Cg-2 de Chartergellus golfitensis

Quando as observações iniciaram, o ninho era formado por quatro favos. Os favos superiores (1 e 2) tinham células com pupas (aproximadamente 40%), e larvas em estado de desenvolvimento avançado. Por outro lado, os favos inferiores (3 e 4) somente tinham células com ovos e poucas larvas. Possivelmente quando começaram as observações, a colônia não tinha produzido nenhuma geração de adultos porque até esse momento as células não pareciam ter sido reutilizadas. Somente uma fêmea (R01) foi observada ovipositando durante as primeiras duas semanas de observação, provavelmente porque a colônia estava passando por um estágio de monoginia. Durante a segunda semana a rainha foi eliminada. O ninho continuou crescendo durante o restante do período de observação (Tabela 8) e mais dois favos foram construídos.

Tabela 8. Fase do ciclo colonial e conteúdo do ninho Cg-2 de *Chartergellus golfitensis* observado no RVSG, Golfito, Costa Rica.

Semana	Novas rainhas	Total rainhas	Fase do ciclo	Ovos	Larvas	Pupas
Abril I	1	1	Estabelecimento	30%	30%	40%
Abril II	Eliminação da rainha	0	Estabelecimento	10%	30%	60%
Maio I	3	3	Produção de adultos e crescimento	10%	10%	80%
Maio II	36	36	Produção de adultos e crescimento	20%	10%	70%
Maio III	15	51	Produção de adultos e crescimento	20%	10%	70%
Maio IV	Coleta		Produção de adultos e crescimento	20%	20%	60%

Ninho Cg-3 de Chartergellus golfitensis

Quando começaram as observações, o ninho era formado por oito favos, a maior parte das células continha pupas (60%). A colônia possivelmente era formada por um enxame reprodutivo da colônia Cg-2 observada em 2011, uma vez que foram observadas cinco fêmeas marcadas dentro da colônia. Quatorze rainhas foram coletadas durante a primeira semana, embora dezesseis fêmeas foram observadas botando ovos. Durante a primeira semana de Abril mais dois favos foram adicionados ao ninho. Durante a primeira e segunda semana de Maio mais dois favos foram construídos e aumentou o tamanho do envelope. Durante a primeira semana de Junho mais indivíduos foram observados dentro do ninho indicando que uma nova geração de adultos emergiu. As observações finalizaram durante o segundo dia da segunda semana de Junho. Foram coletadas 12 fêmeas, seis rainhas e seis fêmeas que foram observadas em posição de ovipositar.

Tabela 9. Fase do ciclo colonial e conteúdo do ninho Cg-3 de *Chartergellus golfitensis* observado no RVSG, Golfito, Costa Rica.

Semana	Novas rainhas	Total rainhas	Fase do ciclo	Ovos	Larvas	Pupas
Fevereiro	Eliminação das rainhas	16	Produção de adultos	30%	30%	40%
Março	10	10	Produção de adultos	20%	20%	60%
Abril I	0	10	Produção de adultos e crescimento	20%	40%	40%
Abril II	1	11	Produção de adultos e crescimento	20%	20%	60%
Maio I	0	11	Produção de adultos e crescimento	15%	15%	70%
Maio II	0	11	Produção de adultos e crescimento	20%	40%	40%
Junho I	0	11	Produção de adultos	20%	40%	40%
Junho II	Coleta	11	Produção de adultos	40%	20%	40%

Ninho Ps-1 e Ps-2 de Polybia selvana

Quando começaram as observações, o ninho Ps-1 estava numa fase estabelecimento uma vez que não havia envelope e era formado somente por dois favos (Fig. 5-A). Somente um dos favos tinha ovos (20%), o resto das células não tinha conteúdo. Durante a única semana de observação somente uma fêmea foi observada fazendo postura, e durante a segunda semana de observações a colônia enxameou. O ninho Ps-2 era formado por três favos. No entanto, somente o favo inferior foi observado para não colapsar o resto do ninho (Fig. 5-B). A maior parte das células do favo observado continha ovos (70%), menos larvas (29%) e poucas pupas (1%). Possivelmente a colônia estava numa fase madura de produção de machos e novas fêmeas uma vez que dentro da população foram observados machos. O número de células com imaturos diminui durante os três dias de observação uma vez que as operárias removeram larvas e pupas das células, possivelmente como resposta ao estresse causado pela manipulação. Durante a segunda semana de observações a

colônia enxameou. Seis rainhas foram marcadas durante os três dias de observação, mesmo assim é provável que o número de rainhas dentro do ninho fosse maior.

Ninho Psp de *Polybia flavifrons*

Possivelmente quando começaram as observações, o ninho estava numa fase matura de crescimento uma vez que durante os três meses de observação as operárias construíram três favos novos. Da mesma forma que em *Protopolybia* e *P. selvana*, somente foram feitas observações no favo inferior do ninho para não colapsar toda a estrutura (Fig. 5-C). A maior parte das células do favo observado não tinha conteúdo durante a primeira semana de observação em Abril. Durante a segunda semana (Maio) a maior parte das células foi observada com ovos (70%) e uma poucas (10%) continham larvas pequenas; adicionalmente, as operárias iniciaram a construção de mais um favo. Na terceira semana a maior parte das células do novo favo não tinha conteúdo e as operárias iniciaram a construção de mais um favo. Durante a quarta semana (Junho) a maior parte das células do novo favo não tinha conteúdo (60%) mas algumas continham néctar (40%). Durante a última semana foram observadas algumas células com ovos (40%) e menos com néctar (10%), mas o resto não tinha conteúdo.

Ninho B-1 de *Brachygastra smithii*

Quando começaram as observações, possivelmente o ninho estava numa fase matura e de produção de machos uma vez que vários indivíduos foram observados dentro da colônia. O ninho era formado por três favos, mas as observações foram feitas somente no favo inferior. A maior parte das células deste favo continha pupas (80%), o conteúdo restante era difícil de observar por causa do local onde estava localizado o

ninho. Durante a segunda semana de observações as operárias começaram a eliminar os imaturos das células do favo observado, muitos indivíduos eram observados fora do ninho, e as operárias pararam de construir o envelope possivelmente como resposta as manipulações. Durante a terceira semana a população enxameou.

B- COMPORTAMENTO DAS RAINHAS E SUA INTERAÇÃO COM AS OPERÁRIAS

A frequência dos comportamentos feitos pelas rainhas variou entre as espécies e entre as fases do ciclo colonial. Por exemplo, alguns comportamentos eram característicos da fase de eliminação de rainhas, e outros foram feitos somente pelas fêmeas de algumas espécies. Mesmo assim, alguns comportamentos foram observados com frequência em todas as colônias estudadas independentemente da fase do ciclo colônia; esses comportamentos que caracterizam as rainhas serão explicados a seguir.

As rainhas se caracterizavam por caminhar e fazer os comportamentos de uma forma mais lenta que as operárias, que são muito ativas dentro do ninho. A inspeção de célula (IC) foi um dos comportamentos feitos com maior frequência pelas rainhas de todas as colônias observadas (Fig. 8). Provavelmente as rainhas inspecionavam células constantemente na procura daquelas vazias para botar ovos, ou de larvas para obter alimento. Segundo Hunt et al. (1987) as larvas digerem o alimento sólidos e produzem uma secreção salivar nutritiva que constitui a principal fonte de alimento para os adultos. Como as rainhas não saem do ninho para forragear, a transferência de fluidos com as larvas e a trofalaxia podem ser as únicas formas para elas obterem alimento. Por este motivo a trofalaxia também foi observada com frequência dentro das colônias (Fig. 8). No caso das colônias que estavam em fase de estabelecimento (Ps-1, Ps-2, Cg-2, Cc-1,

Pe-2, Pe-3, P3-4 e Mt-2), provavelmente a inspeção foi feita para procurar e monitorar as células vazias e não para obter alimento, porque as colônias tinham poucas larvas que ainda não estavam desenvolvidas para processar o alimento. Durante a fase de estabelecimento a trofalaxia pode ser mais importante para as rainhas obterem alimento (Herman et al., 2000).

Além da postura de ovos (OV), o *bending display tipo I* (BD1) foi o comportamento que melhor identificou as rainhas (Fig. 8). Apesar de algumas exceções, somente as rainhas foram observadas fazendo este *display*. As rainhas de *M. miltoni* (Mt-2) e *Brachygastra* fizeram o *bending display I* (BD1) com uma frequência maior do que as rainhas de outras espécies ($\chi^2 = 121,076$ gl= 7 $p < 0,0001$) (Figs. 10 e 11). Este comportamento será analisado com maior detalhe em “Comportamentos associados ao processo de seleção”.

Além dos comportamentos de autolimpeza, *display* e de interação com as operárias, as rainhas não foram observadas fazendo muitas atividades dentro do ninho (embora algumas realizaram tarefas características das operárias). Ao invés, eram observadas ociosas ou escondidas atrás dos favos; em algumas espécies as rainhas raramente eram observadas na parte aberta do ninho. Da mesma forma que o observado em estudos anteriores (Naumann, 1970; West-Eberhard, 1977; Forsyth, 1978; Herman et al., 2000; Mateus, 2005; Nascimento et al., 2004; Chavarría, West-Eberhard, 2010), parece que a principal função das rainhas dentro do ninho é exclusivamente a postura de ovos. Diferente do observado em Vespinae onde as rainhas estimulam e regulam as atividades das operárias, as rainhas de Epiponini não exercem um controle central nem estimulam as atividades dentro da colônia (Spradbery, 1991; Herman et al., 2000). Também diferente do observado em *Polistes*, onde as rainhas ocasionalmente podem forragear e iniciar novas células (Spradbery, 1991), em Epiponini as rainhas não são ativas dentro das colônias nem ajudam nas

tarefas durante a maior parte do ciclo colonial.

O comportamento de postura não mudou muito entre as espécies, sendo que no geral ele era dividido em quatro etapas. Antes de botar um ovo a rainha inspecionava várias células, quando achava uma para fazer a postura ela inseria a cabeça várias vezes até começar botar o ovo (pré-postura). Após a postura, fixava o ovo e depois podia ou não fazer vigilância da célula (para mais detalhes ver descrição dos comportamentos). Apesar do comportamento de postura ser similar entre as espécies, as rainhas de algumas espécies foram observadas fazendo dois comportamentos associados à postura: remover (Rm) e lambar o ovo (LOv). Uma rainha da colônia Mt-1, duas da colônia Pe-2, uma da colônia Cc-1, e uma da colônia Cg-2 foram observadas removendo outra rainha da célula quando estavam fazendo postura (Mt-1 N=3, Pe-2 N=3, Cc-1 N=3, Cg-2 N=2). Este tipo de interação não foi agressiva, após a remoção as rainhas que botaram o ovo geralmente voltavam à célula e continuavam fixando.

As rainhas de *Chartergellus* também foram observadas lambendo o ovo de outras rainhas após a postura. Este comportamento foi feito somente pelas rainhas deste gênero. Após a postura, 18 rainhas de *C. golfitensis* e uma de *C. communis* foram observadas 47 vezes inserindo a cabeça dentro da célula onde outra rainha ovipositou. Estas fêmeas lambiam e antenavam o ovo mesmo quando não era botado por elas. Mateus (2005) também observou este comportamento em *Parachartergus fraternus*, mas como em alguns casos as rainhas comeram os ovos Mateus (2005) associou este comportamento com interações competitivas entre as rainhas. Uma vez que nunca foram observadas rainhas realizando oofagia, possivelmente em *Chartergellus* o comportamento de lambar o ovo esteja relacionado com reconhecimento entre rainhas. Como as rainhas aparentemente podem reconhecer os ovos botados por outras fêmeas em várias espécies (Spradbery, 1991), uma possibilidade é que as rainhas executavam algum tipo de policiamento para determinar a origem do ovo recém-botado. Pode ser

também que a proteção dos ovos fosse de interesse coletivo das fêmeas reprodutoras (Mateus, 2005), e nesse caso as rainhas poderiam estar verificando o estado do ovo botado para determinar se foi fixado corretamente na célula. Entretanto, também poderia estar relacionado à dominância, sendo que as rainhas poderiam lambem o ovo de outras rainhas para adicionar alguma substância de reconhecimento. Mesmo assim, estudos futuros devem ser realizados para determinar o motivo pelo qual as rainhas lambem o ovo de outras rainhas.

Algumas diferenças foram encontradas dos comportamentos feitos pelas rainhas que caracterizam cada espécie; por exemplo, nas colônias de *Metapolybia* o *bending display* I (BD1) também foi feito por algumas operárias; as rainhas de *Chartergellus*, *P. selvana* e *P. flavirfrons* não foram observadas fazendo o *bending display* II (BD2), embora Forsyth (1978) observou rainhas de *P. occidentalis* fazendo o BD2; as rainhas de *Protopolybia* e *Brachygastera* não foram observadas fazendo trabalhos de operárias, semelhante ao observado por Mateus (comunicação pessoal) em *Parachartegus*, e por Nascimento (comunicação pessoal) em *Asteloea*. Como mencionado anteriormente, somente as rainhas de *Chartergellus* lambem o ovo de outras rainhas. As diferenças dos comportamentos para cada espécie serão discutidas com maior detalhe na seção “Evolução dos caracteres comportamentais”.

Figura 8. Comportamentos realizados com maior frequência pelas rainhas de A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-2= *C. golfitensis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) *Metapolybia* (Mt-1= *M. miltoni*, Mt-2= *M. miltoni* colônia 2, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); C) *Protopolybia* (Pp-1= *P. picteti*, Pe-2= *P. exigua*, Pe-3= *P. exigua* colônia-3, Pe-4= *P. exigua* colônia-4); e D) *Polybia* (Ps= *P. selvana*, Psp= *Polybia flavifrons*) e Bg= *Brachygastra smithii*. IC= Inspeção de célula, Tx= trofalaxis, BD1= *bending display* I, OV= ovipositar, Limp= autolimpeza, e Solc= solicitar.

Comportamentos de interação entre rainhas e operárias

As rainhas interagiram com frequência ($N > 30$) com as operárias para realizar trofalaxia. Entretanto, outros comportamentos de interação por parte das rainhas com as operárias foram observados com menor frequência (Fig. 9). Esse resultado é semelhante ao obtido por Herman et al. (2000), que observaram que as rainhas de *P. colobopterus* não interagiam diretamente com as operárias somente para fazer trofalaxia. Por outro lado, as operárias frequentemente ($N > 30$) interagiram com as rainhas para antenar (RAnt) (Fig. 9); mesmo assim a maior parte das rainhas não respondia quando as operárias antenavam (*Chartergellus* 46%, *Metapolybia* 65%, *Protopolybia* 63%, *Polybia* 66%).

As rainhas interagiram com maior frequência com as operárias (e vice versa) para realizar comportamentos de *display* e de teste (Fig. 10). As operárias de *Metapolybia*, *Protopolybia*, *Polybia* e *Brachygastra* testavam constantemente as rainhas pelo comportamento *worker dance* (RWD) (Fig. 10-A, 11-A). Diferentemente, as operárias de *Chartergellus* interagiram menos com as rainhas e as evitavam (SDv) com mais frequência (Fig. 10-A, 11-A). A maior parte das rainhas não responderam ao *worker dance* das operárias (*Chartergellus* 50%, *Metapolybia* 55%, *Protopolybia* 66%, *Polybia* 53%); elas geralmente ficavam quietas ou continuavam fazendo suas atividades normalmente. As rainhas também podiam desviar (Dv) do *worker dance* das operárias (*Chartergellus* 44%, *Metapolybia* 31%, *Protopolybia* 22%, *Polybia* 35%), e raramente podiam responder fazendo *bending display* I (*Metapolybia* 4%, *Protopolybia* 5%, *Polybia* 3%) antenando (*Chartergellus* e *Polybia* 5%, *Metapolybia* e *Protopolybia* 4%) ou com trofalaxia (*Metapolybia* 5%, *Protopolybia* 3%, *Polybia* 4%).

Mesmo quando as operárias interagiram com frequência com as rainhas para fazer o *worker dance*, semelhante ao observado por Herman et al. (2000), as rainhas

não interagiram muito com outras rainhas. A trofalaxia entre rainhas não foi observada com muita frequência (Fig. 9-A,C). Nas colônias de *M. servilis*, *P. picteti*, *P. exigua* e *C. communis* as rainhas fizeram com maior frequência comportamentos de *display* com as operárias do que com outras rainhas (Mt-3A $\chi^2=563,406$ gl=1 $p<0,0001$; Mt-3B $\chi^2=114,123$ gl=1 $p<0,0001$; Cc-1 $\chi^2=208,621$ gl=1 $p<0,0001$; Pp-1 $\chi^2=266,019$ gl=1 $p<0,0001$; Pe-2 $\chi^2=182,084$ gl=1 $p<0,0001$; Pe-4 $\chi^2=189,240$ gl=1 $p<0,0001$; Bg $\chi^2=67,568$ gl=1 $p<0,0001$) (Fig. 11). Na colônia Cg-2 de *C. golfitensis* e nas três colônias de *Polybia*, as rainhas nunca foram observadas fazendo *displays* nem interagindo com outras rainhas. Nas colônias Mt-1 de *M. miltoni* e Cg-3 de *C. golfitensis* as rainhas fizeram com frequência similar *displays* para operárias e outras rainhas. Por outro lado, somente na colônia Mt-2 de *M. miltoni* as rainhas interagiram com maior frequência com outras rainhas para fazer *displays* e testes de dominância (BD1, BD2 e Inv) do que com operárias ($\chi^2=20,575$ gl=2 $p<0,0001$) (Fig. 10-B, 11-B). Como mencionado anteriormente, os comportamentos de *display* e teste serão analisados com maior detalhe em “Comportamentos associados ao processo de seleção”.

É importante notar que as operárias reconhecem as rainhas. Por exemplo, as operárias fizeram o *worker dance* somente em direção das rainhas; o comportamento de desviar (Dv, SDv) também foi feito pelas operárias somente em presença das rainhas. Em outras espécies de Epiponini o reconhecimento das rainhas também foi observado, como, por exemplo, as operárias de *Protopolybia acutiscutis* lambiam as rainhas antes de iniciar o enxame (Naumann, 1970), as rainhas de *Metapolybia aztecoides* são reconhecidas pelas operárias por meio de substâncias liberadas na cabeça (West-Eberhard, 1977), em *Asteloeca ujhelyii* as operárias também testam constantemente as rainhas (Nascimento, 2004). Aparentemente as rainhas podem ter alguma substância característica (odor) que permite a rápida identificação por parte das operárias. Em *Polistes* a glândula de Dufor é mais ativa nas fêmeas dominantes, por

este motivo acredita-se que as secreções desta glândula sirvam como sinal para comunicar a posição dominante da rainha (Downing, Jeanne, 1983). Para Epiponini ainda não se sabe que substância ou secreção de glândula poderia identificar as rainhas, muito embora seja evidente que podem ser reconhecidas pelos membros da colônia.

Figura 9. Comportamentos de interação das rainhas com as operárias (barras inferiores de cor escura: preto, laranja escuro, verde e roxo) e das rainhas com outras rainhas (barras superiores com cores claras: branco, laranja claro, verde limão e lilás) das colônias A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-2= *C. golfitensis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) *Metapolybia* (Mt-1= *M.*

miltoni, Mt-2= *M. miltoni* colônia 2, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); C) *Protopolybia* (Pp-1= *P. picteti*, Pe-2= *P. exigua*, Pe-3= *P. exigua* colônia-3, Pe-4= *P. exigua* colônia-4); e D) *Polybia* (Ps= *P. selvana*, Psp= *Polybia flavifrons*) e Bg= *Brachygastra smithii*. Tx= trofalaxia, Ant= antenar, RAnt= recebe antenar, Solc= solicitar.

Figura 10. Comportamentos de *display* e teste entre rainhas e operárias das colônias A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-2= *C. golfitensis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) *Metapolybia* (Mt-1= *M. miltoni*, Mt-2= *M. miltoni* colônia 2, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); C) *Protopolybia* (Pp-1= *P. picteti*, Pe-2= *P. exigua*, Pe-3= *P. exigua* colônia-3, Pe-4= *P. exigua* colônia-4); e D) *Polybia* (Ps= *P. selvana*, Psp= *Polybia flavifrons*) e Bg= *Brachygastra smithii*. BD1= *bending display* I, RBD1= recebe *bending display* I, RWD= recebe

worker dance, SInv= sendo investida, Dv= desviar, SDv= causar desvio, SM= sendo mordida.

Figura 11. Comportamentos de *display* e teste entre rainhas das colônias A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) *Metapolybia* (Mt-1= *M. miltoni*, Mt-2= *M. miltoni* colônia 2, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); C) *Protopolybia* (Pp-1= *P. picteti*, Pe-2= *P. exigua*, Pe-4= *P. exigua* colônia-4); e D) *Brachygastra* (Bg= *Brachygastra smithii*). BD1= *bending display* I, RBD1= recebe *bending display* I, RWD= recebe worker dance, Inv= Investir, SInv= sendo investida, Dv= desviar, SDv= causar desvio, SM= sendo mordida.

Comportamentos não característicos de rainhas

Algumas rainhas foram observadas fazendo trabalho de operárias nas colônias de *Metapolybia* e *Chartergellus* (Fig. 12). A rainha “original” de *C. communis* foi observada trabalhando dentro do ninho somente duas vezes, entretanto após da remoção da rainha quatro das novas fêmeas reprodutoras foram observadas realizando tarefas de operárias (Fig. 12-A colônia Cc-1). Essas rainhas trabalharam principalmente na construção do envelope (CE) e das células (AC), mas também foram observadas recebendo (RMat) e macerando (Mc) e dividindo material (DivM) entre outras fêmeas (Fig. 12-A). Contudo, durante as primeiras semanas de observação foram observadas 11 fêmeas que ovipositaram (uma ou duas vezes) ou que tentaram ovipositar, mas que também trabalharam (Fig. 12-B). Como a colônia estava em uma fase de estabelecimento, estas fêmeas podem ter sido operárias tentando atingir o status de rainha mas que finalmente se estabeleceram como operárias.

Nas colônias Cg-2 e Cg-3 de *C. golfitensis* as rainhas “originais” não foram observadas trabalhando, mas após sua remoção, nove das 54 “novas” rainhas da colônia Cg-2 e quatro das 12 da colônia Cg-3 foram observadas fazendo tarefas mas com uma frequência muito baixa ($N < 5$) (Fig. 12-A). Somente uma fêmea da colônia Cg-2 foi observada trabalhando na construção do envelope (CE) e uma da colônia Cg-3 na construção de célula. É possível que as novas fêmeas reprodutoras que foram observadas trabalhando após a remoção das rainhas “originais”, fossem reprodutoras temporárias respondendo à falta da rainha na colônia. Estas fêmeas provavelmente eram operárias contribuindo com a reprodução e não rainhas contribuindo com as tarefas, porque enquanto a rainha “original” esteve presente no ninho não foram observadas outras fêmeas fazendo postura (algumas operárias tentaram ovipositar, mas nunca botaram ovos). Pode ser que algumas fêmeas totipotentes responderam à

ausência de rainhas contribuindo na reprodução (West-Eberhard, 1978), mas continuaram realizando tarefas de operárias; diferente de outras fêmeas que não trabalharam e possivelmente estavam tentando atingir o status de rainha.

Na colônia Mt-1 de *M. miltoni* somente cinco fêmeas reprodutoras foram observadas fazendo comportamentos característicos de operárias durante as duas primeiras semanas de observação. Algumas destas fêmeas provavelmente eram rainhas temporárias que trabalharam para responder à falta de operárias uma vez que muitas das fêmeas jovens estavam migrando da colônia. Da mesma forma que em *Chartergellus*, na colônia Mt-3A de *M. servilis* as rainhas foram observadas trabalhando somente após a remoção das rainhas “originais”. Seis das “novas” rainhas foram observadas trabalhando uma ou duas vezes, enquanto uma fêmea trabalhou 13 vezes; mesmo assim a frequência de trabalho foi muito baixa nessa colônia (Fig. 12-C). A frequência de trabalho foi menor durante 2012 (Mt-3B Fig. 12-C), onde somente duas rainhas foram observadas trabalhando (N=4). Entretanto, a frequência pode ter sido menor porque as rainhas quase não foram observadas na parte aberta do ninho em 2012 (a colônia enxameou antes do término das observações).

De todas as colônias observadas foi na Mt-2 de *M. miltoni* onde mais rainhas foram observadas trabalhando: 14 das 20 rainhas marcadas foram observadas realizando tarefas de operárias. Diferente do observado em *Chartergellus* e na colônia Mt-3 de *Metapolybia* as rainhas foram observadas trabalhando com maior frequência durante as primeiras semanas de observação e não após a remoção das rainhas “originais” (Fig. 12-D). Isto porque quando começaram as observações, a colônia Mt-2 estava passando por uma fase de estabelecimento onde a quantidade de indivíduos para manter as necessidades da população (tanto reprodutivas como de manutenção) podia ser reduzida. Durante estas fases iniciais podem ser observadas rainhas temporárias que contribuem na reprodução e manutenção até a nova geração de

operárias emergir e as novas rainhas estabelecerem-se (West-Eberhard, 1978). As colônias de *Chartegellus* e Mt-3A,B apresentava rainhas estabelecidas no começo das observações e, por esse motivo, possivelmente as rainhas que trabalharam somente foram observadas após as remoções.

Por outro lado, somente uma rainha em uma colônia de *Protopolybia* e outra em *Polybia selvana* foram observadas fazendo trabalhos, mas com uma frequência muito baixa (*Protopolybia* N=7, *Polybia* N=4). No caso da colônia Pe-4 de *Protopolybia*, a fêmea que foi observada trabalhando tinha sido expulsa da colônia durante as primeiras semanas porque outras fêmeas se estabeleceram como rainhas. Possivelmente esta fêmea tornou-se operária para não ser expulsa do ninho novamente, e por esse motivo foi observada trabalhando apesar de ter os ovários desenvolvidos e estar inseminada. A rainha de *Polybia selvana* foi observada duas vezes macerando material e dividindo com as operárias. Possivelmente o material utilizado pela rainha era alimento uma vez que não foi observada trabalhando em construção. Como a colônia estava numa fase de estabelecimento e sem imaturos para processar o alimento, a rainha deveria solicitar alimento às operárias que são a única fonte de recurso disponível durante as primeiras fases do ciclo colonial. Neste caso, parece que a manipulação de material por parte da rainha respondeu à necessidade de obter alimento, e não à colaboração nas tarefas do ninho.

A flexibilidade das castas encontrada em *M. miltoni* e *C. communis* é um traço muito importante para o desempenho da colônia, uma vez que permite que os indivíduos sejam mobilizados para realizar diferentes tarefas quando for necessário (Karsai, Wenzel, 2000). A flexibilidade é um traço muito importante para a sobrevivência da colônia durante um enxame (de fuga ou reprodutivo), ou para responder à falta de indivíduos para realizar tarefas (West-Eberhard, 1982; Karsai, Wenzel, 2000; Sendova-Franks, Franks, 1999; Beshers, Fewell, 2001; Nowak et al., 2010). Se a colônia tivesse

que migrar poderia ocorrer a perda de alguns indivíduos durante o deslocamento, ou durante a divisão (em enxame reprodutivo); se os indivíduos estivessem determinados a realizar uma tarefa específica, a colônia poderia morrer, uma vez que não teria a capacidade de substituir as operárias ou as rainhas até uma nova geração de indivíduos emergir. Por este motivo, nas colônias de Epiponini algumas rainhas são observadas colaborando com as tarefas, e algumas operárias com a reprodução. West-Eberhard (1982) observou que as rainhas de *M. aztecoides* eram as encarregadas de todo o forrageio durante as fases de estabelecimento, quando a quantidade de operárias na colônia era reduzida. A flexibilidade de casta nos Epiponini não está relacionada com um menor grau de complexidade social (Bourke, 1999), mas com a sobrevivência das colônias. De qualquer forma, os comportamentos observados evidenciam que as rainhas de *Metapolybia* e *Chatergellus* não necessariamente se comportam como rainhas durante todas as fases do ciclo colonial. Esses resultados reforçam as observações morfométricas de Noll e Zucchi (2000, 2002), que mostraram que em estágios iniciais de desenvolvimento da colônia em espécies que apresentam castas mais definidas, existe menor diferença morfológica entre rainhas e operárias, sendo difícil identificá-las visualmente, e conforme o ciclo colonial se desenvolve, e o número de rainhas diminui, as rainhas sobreviventes são claramente mais distintas que as operárias.

Figura 12. Comportamentos característicos de operárias realizados por rainhas das colônias de A) *Chartergellus* (Cc-1= *C. communis*, Cg-2= *C. golfitensis*, Cg-3= *C. golfitensis* colônia-3); B) intermediárias da colônia Cc-1 de *C. communis*; C) rainhas de *Metapolybia* (Mt-1= *M. miltoni*, Mt-3A= *M. servilis* 2011, Mt-3B= *M. servilis* 2012); e D) rainhas de *M. miltoni* (Mt-2= colônia 2) atividades feitas por data de observação. CE= construção do envelope, Mc= macerar, RMat= receber material, AC= aumentar célula, DivM= dividir material.

Comportamento das fêmeas recém emergidas

Poucas fêmeas recém emergidas foram marcadas devido à dificuldade em localizá-las no momento exato da emergência e pela disposição dos favos no ninho que dificultou a marcação (em *Chartergellus*, *Protopolybia* e *Polybia*). Também, em alguns casos, as recém-emergidas saíam muito rápido da célula para o interior do ninho o que dificultava a marcação, ou após a marcação não eram observadas na parte aberta do ninho novamente. No total foram marcadas oito fêmeas: três na colônia Pp-1 de *P. picteti*, uma na colônia Mt-3A de *M. servilis*, duas na colônia Cg-3 de *C. golfitensis*, e uma na colônia Mt-3B de *M. servilis*. Mesmo assim, somente puderam ser observados os comportamentos de três indivíduos na análise dos vídeos, porque a maior parte das fêmeas marcadas não foi observada na parte aberta do ninho.

A fêmea observada na colônia Mt-3A foi coletada, tinha ovários tipo O1 e espermateca vazia. Uma das fêmeas marcadas na colônia Cg-3 de *C. golfitensis* foi coletada e tinha ovários tipo O3 e espermateca vazia. Nenhuma das fêmeas marcadas na colônia Pp-1 de *P. picteti* foi coletada. Da mesma forma que as rainhas, a maior parte do tempo as recém emergidas foram observadas inspecionando células (IC) (Fig. 13), e fazendo trofalaxia (Tx). Estas fêmeas foram observadas interagindo somente com as operárias, nunca com as rainhas. As operárias interagiram com as recém emergidas da mesma forma que com outras operárias, não foi observado nenhum comportamento agressivo por parte das operárias ou das rainhas contra as recém emergidas. Este resultado é diferente do observado em *M. aztecoides* (West Eberhard, 1978) e *A. ujhelyii* (Nascimento, 2004) onde aparentemente as rainhas são agressivas com as recém emergidas para suprimir o desenvolvimento de seus ovários; também é diferente do observado por Strassmann et al. (2002) e Platt et al. (2004) que observaram que as operárias eram agressivas com as recém emergidas para evitar que atingissem o status

de rainha. Quando foram feitos os testes de remoção nenhuma das recém emergidas marcadas foi observada substituindo a rainha, como será explicado na seção “Seleção e Totipotência das rainhas” na maior parte das colônias observadas, foram fêmeas de idade média e velhas as que substituíram a rainha, e não fêmeas novas. De modo geral, as recém-emergidas agiram e interagiram da mesma forma que as operárias, pois foram observadas fazendo trabalhos dentro do ninho e não foram observadas fazendo *displays* característicos de rainhas (Fig. 13). Diferente do observado por West-Eberhard (1978, 1982) em *M. aztecoides*, quando a rainha original foi ausente, as recém emergidas não botaram ovos. O comportamento das recém emergidas não mudou apesar que as colônias foram estimuladas para passar por um processo de seleção.

Figura 13. Comportamentos realizados pelas fêmeas recém-emergidas das colônias Pp-1 de *Protopolybia picteti*, Cg-3 de *Chartergellus golfitensis* e Mt-3B de *Metapolybia servilis* (IC= inspeção de célula, Tx= trofalaxis, Limp= auto limpeza, CE= construção do envelope, DivMat=

dividir material, RMat= receber material, Ant= antenar, RAnt= receber antenação, AC= aumentar célula, Mc= macerar).

Conclusões sobre a interação e comportamentos das rainhas

- ⇒ O *bending display* I é um *display* característico das rainhas, embora em *Metapolybia* também possa ser feito pelas operárias.
- ⇒ O *bending display* II não foi observado em *Chartergellus* nem nas espécies de *Polybia* estudadas.
- ⇒ As rainhas no geral interagiram menos com outras rainhas do que com as operárias, com exceção das rainhas de *M. miltoni*.
- ⇒ As rainhas interagiram com as operárias principalmente para realizar trofalaxia e comportamentos de *display*.
- ⇒ As operárias interagem constantemente com as rainhas para realizar *worker dance* em *Metapolybia*, *Protopolybia*, *Polybia* e *Brachygastra*.
- ⇒ As operárias reconhecem as rainhas que possivelmente possuem alguma substância (odor) que as identifica.
- ⇒ Mesmo quando a principal função das rainhas é a reprodução, elas mostram flexibilidade para realizar outras tarefas dentro do ninho.
- ⇒ As rainhas de *Protopolybia* e *Brachygastra* não foram observadas realizando trabalhos dentro do ninho, semelhante ao observado em *Parachartergus* e *Asteloeca*.
- ⇒ As recém-emergidas se comportaram como operárias, e não foram observadas substituindo as rainhas.
- ⇒ Operárias e rainhas não foram agressivas com as recém-emergidas.

C- SELEÇÃO E TOTIPOTÊNCIA DAS RAINHAS

O processo de seleção de rainhas tem características particulares para cada gênero, assim como mecanismos em comum. Como será mostrado nas seções seguintes, é evidente que a variação das estratégias utilizadas pelas espécies de clados distintos em relação à determinação de casta, construção de ninhos e forrageio também influa no processo de seleção e eliminação de rainhas, assim como os comportamentos associados a ele. Há diferenças mesmo entre as espécies de um mesmo clado, o que mostra que o processo de seleção de rainhas definitivamente não pode ser explicado através do estudo de uma ou poucas espécies, e deve focar em espécies até agora desconhecidas.

O processo não foi observado em todas as colônias estudadas; a colônia Mt-1 de *Metapolybia miltoni*, por exemplo, não passou por um processo de seleção durante o período de observação; a colônia Pe-3 de *Protopolybia exigua* enxameou depois de duas semanas de observação, da mesma forma que duas colônias de *Polybia selvana* e uma de *Brachygastra smithii*. Como foi mencionado anteriormente, parece que os indivíduos jovens da colônia Mt-1 estavam abandonando a colônia e, como consequência, as novas fêmeas possivelmente não estavam tentando atingir o status de rainha e por este motivo os comportamentos *display*, teste e agressivos foram feitos por poucas fêmeas (N=4) e com pouca frequência. Também pode ter acontecido que o número de rainhas fosse estável e por este motivo os comportamentos de teste e agressivos fossem reduzidos. As manipulações também podem ter diminuído a frequência com que as rainhas eram observadas na parte aberta do ninhos de Mt-1; semelhante as manipulações podem ter estimulado as colônias Pe-3, Ps-1, Ps-1 e Bg enxamear. Diferente de outras colônias estudadas, possivelmente os indivíduos destas

colônias não toleraram que o envelope fosse removido, nem as manipulações feitas com os indivíduos. Por este motivo, o processo de seleção não será descrito para estas colônias, mas sim os comportamentos *display* e de teste que puderam ser observados.

Estabelecimento das rainhas

Aparentemente, em *Chartergellus* e *Metapolybia* no início do ciclo colonial, ou diante da ausência da rainha, vários indivíduos tentam estabelecer-se como fêmeas reprodutoras. Entretanto, enquanto o ciclo progride a quantidade de novas rainhas diminui. Por exemplo, no ninho Mt-2 de *Metapolybia miltoni* a quantidade de rainhas aumentou em relação ao número inicial durante os primeiros meses de observação até atingir um máximo de 19 fêmeas reprodutoras no começo de Dezembro, mas durante os meses de Janeiro e Fevereiro o número de rainhas diminuiu até seis. De forma semelhante, na colônia Cc-1 de *Chartergellus communis*, durante a primeira semana de observações foram marcadas 11 fêmeas botando ou tentando botar ovos (Tabela 6), mas o número diminuiu até uma rainha (R03). Somente o indivíduo R03 continuou botando ovos e comportando-se como rainha durante o restante do período de observação. Da mesma forma, no ninho Cg-3 de *Chartergellus golfitensis*, das 13 fêmeas reprodutoras que foram observadas somente sete continuaram botando ovos até o final das observações, quatro meses depois. As “novas” rainhas tinham a espermateca inseminada, ovários tipo O6 (Fig. 6), e eram de idade intermediária (M) ou velha (PL) (Fig. 7).

Depois da eliminação da(s) rainha(s) “original(is)” durante os testes de remoção, o número de fêmeas reprodutoras aumentou para depois diminuir. Quinze dias após a eliminação das seis rainhas “originais” da colônia Mt-2 de *M. miltoni*, dezesseis fêmeas foram observadas fazendo comportamentos de rainha e seis fêmeas foram observadas

botando ovos. Na colônia Mt-3A de *M. servilis*, 19 fêmeas foram observadas botando ovos, e 53 fazendo o *bending display* I após a eliminação das seis rainhas “originais”; somente seis das 46 “novas” fêmeas reprodutoras coletadas não eram rainhas. No ninho Cc-1 de *C. communis*, após a eliminação da única rainha da colônia (R03), 36 fêmeas foram observadas em posição de ovipositar; das 26 fêmeas que foram coletadas observou-se que 16 eram operárias [com ovários tipo O1 (N=8), O2 (N=5), O3 (N=3) e espermoteca vazia], e 10 eram rainhas inseminadas [com ovários O6 (N=9) e O5 (N=1)]. No ninho Cg-2 de *C. golfitensis*, após a eliminação da única rainha, 54 fêmeas foram observadas em posição de ovipositar. Todas as “novas” rainhas que foram coletadas (N=35) tinham espermoteca inseminada, idade intermediária (M), e ovários tipo O5, com exceção de uma fêmea com ovários tipo O6.

Por outro lado, em duas das colônias onde foram feitos os testes de remoção, não observamos um aumento na quantidade de fêmeas reprodutoras após a eliminação da rainha “original”. Durante a segunda fase de observações da colônia Mt-3 de *M. servilis* (Mt-3B), somente onze fêmeas foram observadas ovipositando após a eliminação das doze rainhas “originais”. Todas as rainhas (“originais” e “novas”) tinham a espermoteca inseminada, ovários tipo M4 e eram indivíduos velhos (PL e PG). Igualmente, no ninho Cg-3 de *C. golfitensis* após a eliminação das 13 rainhas “originais” somente 12 fêmeas foram observadas botando ovos, embora 23 foram observadas em posição de ovipositar. Como mencionado anteriormente, somente seis das 12 rainhas “novas” continuaram dentro da colônia até o fim das observações. Possivelmente a metade das “novas” rainhas foram expulsas ou migraram do ninho.

Em *Protopolybia* o estabelecimento de rainhas foi diferente das demais espécies. Após a eliminação das cinco rainhas “originais” da colônia Pp-1 de *P. picteti*, foram observadas treze rainhas “novas”. Embora algumas operárias fossem observadas em posição de botar, a eliminação das rainhas não estimulou este comportamento, uma vez

que estas fêmeas foram observadas inserindo o abdômen constantemente nas células durante todo o período de observação. Ou seja, houve um aumento na quantidade de fêmeas que tentaram botar ovos, mas não foi tão grande como em algumas colônias de *Metapolybia* e *Chartergellus*. Uma amostra (N=27) das operárias que foram observadas em posição de botar foi coletada e nenhuma das fêmeas era intermediária (O5), quatro apresentavam ovários tipo O4 e o resto tinha ovários tipo O1 e O2 (Fig. 6), todas com espermateca vazia.

No ninho Pe-2 de *P. exigua*, das onze rainhas que foram observadas no começo do ciclo, somente três não estavam na colônia no momento da coleta. Diferente do observado nas colônias Mt-2, Cc-1 e Cg-3 de *Chartergellus* e *Metapolybia*, em *P. exigua* o número de rainhas não diminuiu nem à metade da quantidade original durante os três meses de observação. Na colônia Pe-4 de *P. exigua* o processo foi diferente; três rainhas se estabeleceram na colônia no momento da fundação, enquanto as operárias (N=3) e rainhas (N=6) que tentavam atingir o status de reprodutora foram expulsas. Quando estas fêmeas tentaram voltar ao ninho, as operárias as morderam fortemente até que elas saíssem novamente. Em síntese, parece que em *P. exigua* também há uma diminuição no número de rainhas ao longo do ciclo colonial, mas a redução não é tão grande como em *Chartergellus* e *Metapolybia*.

O testes de remoção não puderam ser feitos em nenhuma das colônias estudadas de *Polybia* e *Brachygastra* devido a dificuldade para trabalhar com elas. Como explicado anteriormente, os indivíduos das colônias de *Polybia selvana*, e *Brachygastra smithii* não toleraram as manipulações feitas e enxamearam, e por este motivo foram observados poucos dias. Na colônia de *Polybia flavifrons* que foi observada por mais tempo (cinco semanas) os testes não puderam ser feitos porque as rainhas foram difíceis de observar; por exemplo, quando estavam na parte aberta do ninho era por poucos minutos, e nas últimas semanas de trabalho não foram

observadas. Outra colônia de *Polybia* foi observada no fim de 2012 por duas semanas no Brasil, entretanto as rainhas nunca foram observadas na parte aberta do ninho; e da mesma forma que as outras colônias esta também enxameou. Mesmo assim, das observações que foram feitas notamos que, da mesma forma que em *Protopolybia*, fêmeas constantemente inserem o abdômen nas células ao longo das diferentes fases do ciclo colonial. Estas fêmeas agiam mais como operárias do que como rainhas.

Em síntese, pelos resultados obtidos até agora parece que em *Metapolybia* e *Chartergellus* acontece algo semelhante ao observado por West-Eberhard (1978) em *M. aztecoides*, onde durante as primeiras fases do ciclo há um número maior de rainhas, mas conforme a colônia cresce o número delas diminui. Como mencionado anteriormente, nas colônias Mt-2, Cc-1 e Cg-3 o número de rainhas foi reduzido até a metade da quantidade original. Por outro lado, em *Protopolybia* a proporção de rainhas não diminuiu muito durante o período de observações. Adicionalmente, parece que em *Protopolybia* as rainhas são selecionadas no início do ciclo quando a colônia ainda está em processo de estabelecimento, e não nas outras fases; uma vez que a expulsão de fêmeas reprodutoras foi durante a fundação e não durante fases avançadas na colônia Pe-4, e que o número de rainhas não foi reduzido na colônia Pe-2. Em *Chartergellus* parece que a seleção também ocorre nas etapas iniciais do ciclo, mas não necessariamente durante a fase de estabelecimento; e em *Metapolybia* parece que a seleção ocorre durante a fase de produção de adultos.

No caso de *Protopolybia* a pouca redução do número de rainhas ao longo do ciclo, e a seleção delas durante as primeiras fases podem estar associados a vários fatores. É possível que as rainhas que se estabelecem no início do ciclo sejam suficientes para manter as necessidades da população; ou que estas fêmeas possam ser favorecidas pelas operárias por serem velhas (PL e PG). Como mencionado anteriormente, as rainhas velhas são preferencialmente selecionadas em detrimento

das novas para aumentar o parentesco entre a progênie da colônia (Strassmann et al., 2002). Entretanto, também poderia estar relacionado ao curto ciclo de vida que as colônias de *Protopolybia* tem. Simões (1977) observou que as colônias de *P. exigua* tinham uma média de duração de três meses (106 dias), e que o principal motivo pelo qual as colônias enxameavam era a infestação de moscas da família Phoridae. Como as colônias tem pouco tempo para produzir uma nova geração de indivíduos, possivelmente as rainhas são selecionadas no começo e mantidas durante todo o ciclo, para garantir a reprodução da colônia antes que a infestação por moscas force a população deixar o ninho. Como o número de rainhas não aumenta nem diminui, provavelmente o relacionamento genético entre os membros da colônia também é alto (Gastreich et al., 1993).

Por outro lado, em *Chartergellus* e *Metapolybia* que apresentam ciclos coloniais mais extensos (um ano ou mais), durante o começo do ciclo pode haver maior tolerância reprodutiva entre as fêmeas para aumentar o tamanho da população. Segundo West-Eberhard (1978), durante as primeiras fases do ciclo colonial a capacidade reprodutiva das novas rainhas pode ser insuficiente para produzir a quantidade necessária de operárias para manter as necessidades do novo ninho. Por este motivo, pode haver várias fêmeas botando ovos no começo do ciclo; no entanto, quando a capacidade reprodutiva das rainhas aumenta, o número de rainhas diminui e um novo processo de seleção inicia.

Em relação aos testes de remoção de rainhas, como mencionado anteriormente, em duas colônias de *Metapolybia* e *Chartergellus* foi observado um aumento muito grande (N=72) das fêmeas que tentaram suprir a falta de rainhas. No entanto, esse aumento não foi observado em algumas colônias: colônia Mt-3B de *M. servilis*, colônia Cg-3 de *C. golfitensis* e Pp-1 de *P. picteti*. Possivelmente o aumento na quantidade de “novas” rainhas não foi observado porque no momento das remoções é provável que

nem todas as rainhas fossem eliminadas. Se dentro das colônias os indivíduos reprodutores não fossem completamente eliminados, o processo de remoção não estimularia a postura de outras fêmeas (ou estimularia menos fêmeas) porque a colônia ainda teria rainhas suficientes para gerar novos indivíduos. Por exemplo, pode ser que a quantidade de rainhas “originais” na colônia Mt-3B de *M. servilis* fosse de 23 e somente a metade das rainhas (N=11) foram eliminadas. No caso da colônia Pp-1 de *P. picteti* a arquitetura do ninho foi um fator limitante na hora de identificar as rainhas. Uma vez que só foram feitas observações no favo inferior do ninho, pode ser que nem todas as rainhas fossem identificadas antes de fazer as remoções.

Operárias tentaram atingir o status de fêmea reprodutora após a remoção da(s) rainha(s) em *Metapolybia* e *Chartergellus*, uma vez que algumas foram observadas com o abdômen inserido nas células. As operárias podiam estar tentando atingir o status de rainha aproveitando que a tolerância reprodutiva da população aumenta frente a ausência da rainha (West-Eberhard, 1978). Adicionalmente, em *Metapolybia* também foram observadas operárias fazendo o comportamento *bending display* I característico das rainhas (West-Eberhard, 1978). Neste caso as operárias de *Metapolybia* podiam estar testando a capacidade reprodutiva das potenciais rainhas durante o processo de seleção pelo *BD1*; os comportamentos de *display* serão discutidos em “Comportamentos associados ao processo de seleção”. Por outro lado, em *Protopolybia* parece que as intermediárias (que também são operárias) tentam ovipositar constantemente, como observado esporadicamente por Simões (1977). Segundo Gastreich et al. (1993) a presença de intermediárias é característica de colônias de espécies onde os ninhos são destruídos com frequência como *Protopolybia exigua* e *Polybia occidentalis*. Para algumas fêmeas manter os ovários ativos pode ser uma vantagem uma vez que poderiam tentar atingir o status de rainha em caso que a colônia fizesse enxame (reprodutivo ou de fuga) (West-Eberhard, 1978). No caso das colônias de

Protopolybia onde os ciclos coloniais são curtos, pode ser conveniente para as intermediárias manter os ovários ativos porque poderiam atingir o status de rainha no momento da fundação de uma nova colônia.

Mesmo quando o número de “novas” rainhas aumentou mais em algumas espécies do que em outras, a substituição da rainha aconteceu em todas as colônias onde o teste de remoção foi realizado, uma vez que novas fêmeas foram observadas botando ovos. Esse resultado mostra que as fêmeas de Epiponini são totipotentes, e que a ausência da(s) rainha(s) pode estimular o estabelecimento de novas fêmeas reprodutoras e não o abandono do ninho. A totipotência será discutida a seguir.

Totipotência das fêmeas

Os dados mostram que algumas fêmeas dentro das colônias estudadas têm plasticidade reprodutiva e podem suprir a ausência de rainhas. Como foi mostrado na seção “Estabelecimento de rainhas”, nas colônias onde foram feitos os testes de remoção, novas fêmeas foram observadas botando ovos. No caso das colônias Mt-3A (2011) de *M. servilis*, Pp-1 de *P. picteti* e Cg-2 de *C. golfitensis* as “novas” rainhas apresentaram um grau de desenvolvimento ovariano menor que as rainhas “originais”. No ninho Mt-3A de *M. servilis*, todas as rainhas coletadas após a eliminação das rainhas “originais” apresentavam ovários tipo O4, enquanto as rainhas “originais” tinham ovários tipo O6 (Fig. 14-A). No ninho Pp-1 de *P. picteti* somente uma das “novas” rainhas apresentava ovários O6, o restante apresentava ovários do tipo O2 (N=1), O4 (N=4), e O5 (N=3) (Fig. 14-B). Na colônia Cg-2 de *C. golfitensis* 30 das “novas rainhas” que foram coletadas apresentavam ovários O5 e somente uma fêmea (R54) apresentava ovários O6, da mesma forma que a rainha “original” (Fig. 14-D).

Por outro lado, nos ninhos Cc-1 de *C. communis*, Cg-3 de *C. golfitensis* e Mt-3B

de *M. servilis*, a maior parte das “novas” rainhas apresentava o mesmo grau de desenvolvimento de ovários que a rainha “original”. Na colônia Cc-1 somente uma das novas fêmeas reprodutoras apresentava ovários O5, o resto era do tipo O6 (Fig. 14-C). Na colônia Cg-3 seis das rainhas “originais” apresentava ovários do tipo O6 e sete tinham ovários tipo O5; por outro lado, todas as “novas” rainhas tinham ovários tipo O6 (Fig. 14-E). Da mesma forma na colônia Mt-3B, todas as “novas” rainhas da mesma forma que as “originais” tinham o maior grau de desenvolvimento ovariano (O6). Como mencionado na seção “Estabelecimento das rainhas”, possivelmente as “novas” rainhas das colônias Cg-3 e Mt-3B tinham o mesmo grau de desenvolvimento ovariano que as rainhas “originais”, porque possivelmente nem todas as rainhas “originais” foram eliminadas durante os testes de remoção. Como consequência, possivelmente as “novas” rainhas na verdade eram rainhas “originais” que não puderam ser eliminadas.

Os resultados mostram que a delimitação de casta nos Epiponini pode ser feita mediante algum tipo de sinalização química por parte das rainhas (Naumann, 1970; West-Eberhard, 1977; Forsyth, 1978; Fletcher, Ross, 1985; Spradbery, 1991; Keller, Noacs, 1993), uma vez que o desenvolvimento de ovários das outras fêmeas foi limitado a situações em que a(s) rainha(s) estava(m) ausente(s). Antes do teste de remoção, somente as fêmeas que foram marcadas como rainhas no início das observações botaram ovos. No entanto, após a remoção, novas fêmeas foram observadas tentando e botando ovos. A eliminação da(s) rainha(s) pode ter estimulado o desenvolvimento de ovários de algumas fêmeas (colônias Mt-3A, Cg-2 e Pp-1, onde as “novas” rainhas tinham menor grau de desenvolvimento); ou estimular o comportamento de ovipositar em fêmeas com ovários com algum grau de desenvolvimento, que podiam estar limitadas pela presença da(s) rainha(s).

Em relação à idade das novas fêmeas reprodutoras, somente na colônia Pp-1 de *P. picteti* as “novas” rainhas eram jovens em sua maioria (MC); nas colônias Mt-3A

(77%) e Mt-3B (100%) de *M. servilis* a maior parte das “novas” rainhas era velha (Fig. 14-A). Nos ninhos Cc-1 de *C. communis* e Cg-2 de *C. golfitensis*, a maior parte das “novas” rainhas era de idade intermediária (M) (Fig. 14-C,D); e na colônia Cg-3 de *C. golfitensis* a metade das “novas” rainhas era velha (PL) e a outra metade era de idade intermediária (Fig. 14-E).

Os resultados mostram que não somente as fêmeas jovens podem ser totipotentes, diferente do observado em estudos anteriores (West-Eberhard, 1978, 1982; Strassmann et al., 2002; Platt et al., 2004). Nas colônias estudadas após os testes de remoção, foram observadas fêmeas velhas e de idade intermediária que ativaram seus ovários e substituíram a rainha. De forma semelhante, em *Polistes* as fêmeas velhas, que tem um maior grau de desenvolvimento de ovários, são as que substituem a rainha (Strassmann, Meyer 1983; Spradbery, 1991). Se dentro da colônia somente as fêmeas jovens fossem totipotentes, os indivíduos que substituíram a rainha seriam somente aquelas com padrões de idade Am ou MC (Fig. 7), uma vez que as outras fêmeas seriam muito velhas para desenvolver seus ovários. No entanto, não foram observadas rainhas “novas” de idade Am, nem fêmeas recém emergidas substituindo a rainha.

No caso das colônias de *Protopolybia* e *Chartergellus*, as “novas” rainhas também poderiam ter sido intermediárias que diante da ausência da rainha foram inseminadas e botaram ovos. Como explicado anteriormente a presença de intermediárias é característica de colônias onde os ninhos são destruídos com frequência, como é o caso de *Protopolybia* (Gastreich et al., 1993). Mas, em *Chartergellus* os dados obtidos das colônias estudadas (*C. communis*: Mateus et al., 1997; *C. golfitensis*: Chavarría, West- Eberhard, 2010; e a colônia N-1 de *C. communis* analisada) mostram que dentro das populações a quantidade de intermediárias é reduzida (Tabela 10), sendo pouco provável que somente as intermediárias substituíssem a rainha. Como a presença de intermediárias não é comum dentro de

Metapolybia e *Chartergellus*, é possível que a flexibilidade para desenvolver os ovários possa explicar melhor porque fêmeas velhas foram observadas substituindo as rainhas.

A flexibilidade das operárias em aceitar novas rainhas diante da ausência da(s) rainha(s) original(is) também foi observada. Na colônia Pe-4 de *P. exigua* três fêmeas se estabeleceram como rainhas no começo do ciclo e várias fêmeas foram expulsas durante o período de estabelecimento. Entretanto, quando as rainhas “originais” foram removidas, as operárias aceitaram de novo as fêmeas que tinham sido expulsas, para que substituíssem às rainhas. É possível que as fêmeas expulsas foram favorecidas pelas operárias, para manter o parentesco entre os membros da colônia, uma vez que estes indivíduos eram parte da colônia original. Como foi mencionado anteriormente, a flexibilidade é um traço muito importante para o desempenho das colônias nos Epiponini, uma vez que permite à população responder ante situações adversas (Karsai, Wenzel, 2000).

Nas espécies estudadas tem determinação imaginal das castas, ou seja, todas as fêmeas são totipotentes ao emergir portanto podendo-se tornar rainhas ou operárias (West-Eberhard, 1978, 1982; Strassmann et al., 2002). Segundo estudos feitos anteriormente (West-Eberhard, 1978, 1982; Strassmann et al., 2002; Platt et al., 2004) geralmente são as fêmeas jovens que substituem a rainha. Por este motivo, foi argumentado que depois de certa idade as fêmeas apresentam menor chance de se tornar rainhas. Entretanto, os resultados obtidos mostram que nem em todas as colônias as fêmeas jovens substituem a rainha. Parece que a capacidade das fêmeas para desenvolver os ovários frente a falta da reprodutora não é limitada pela idade e poderia estar relacionada com outros fatores como a idade da população e a flexibilidade de casta.

Por exemplo, a substituição da rainha por fêmeas jovens ou velhas, poderia estar mais relacionada com a idade da população no momento da perda da rainha ou do

enxame. Nas colônias Cc-1 e Cg-3 não foram encontradas fêmeas jovens dentro das amostras coletadas (ver “Conteúdo dos ninhos, população e ciclo colonial”). Se as fêmeas jovens estavam migrando, é claro que os indivíduos jovens não poderiam substituir a rainha “original”. Como argumentado por Chavarría e Noll (*in press*) as fêmeas são distribuídas na colônia para realizar diferentes tarefas em relação às necessidades, e não com a idade dos indivíduos. Se em colônias “velhas” com indivíduos de idade homogênea, somente as fêmeas jovens pudessem desenvolver seus ovários, a colônia estaria limitada à emergência de novas fêmeas para substituir a rainha e produzir uma nova geração de operárias. Esta situação, dependendo do estado do ninho e da população, poderia levar a perda de toda a colônia. Por outro lado, nas colônias Mt-3A, Mt-3B e Pp-1 que tinham uma população heterogênea e foram encontradas fêmeas jovens (MC), também foram fêmeas velhas e de idade intermediária as que substituíram a rainha. Mesmo assim, como estas colônias não foram coletadas, é difícil saber a proporção real de indivíduos jovens e velhos na população.

De qualquer forma, a plasticidade das fêmeas para desenvolver seus ovários é evidente. Nas colônias de *Chartergellus* e *Protopolybia* há operárias com diferentes graus de desenvolvimento de ovários. No gênero *Metapolybia*, apesar das fêmeas não apresentarem tanta variabilidade no grau de desenvolvimento de ovários (Baio et al., 2003; Noll et al., 2004), quando foram realizados os testes de remoção (*M. servilis*) as fêmeas desenvolveram um tipo de ovário a mais com desenvolvimento intermediário (O4) (que não é observado em colônias não manipuladas). Este resultado mostra que as operárias sem desenvolvimento ovariano (intermediárias) também têm plasticidade para desenvolver seus ovários e substituir a rainha.

Em síntese, os resultados mostram que as fêmeas dos Epiponini podem alterar a ativação de seus ovários como resposta às mudanças na dinâmica da população.

Igualmente, nas vespas do gênero *Vespa* as operárias podem desenvolver os ovários e botar ovos poucos dias após a perda da rainha (Spradbery, 1991). Como as castas das espécies estudadas não são determinadas durante o estado larval, em alguns Epiponini a flexibilidade encontrada provavelmente é devida à plasticidade fenotípica (West-Eberhard, 1989, 2003) que permite aos indivíduos responder às mudanças mais proximais. A flexibilidade de casta é um traço muito importante para a sobrevivência das colônias de vespas e outros insetos sociais (Sendova-Franks, Franks, 1999; Karsai, Wenzel 2000; Beshers, Fewell, 2001; Korb, Heinze, 2004; Nowak et al., 2010) uma vez que permite às colônias distribuir indivíduos para realizar diferentes tarefas segundo as necessidades da população. Nos Epiponini, essa flexibilidade é muito importante no momento de fundar uma nova colônia, uma vez que os ninhos são destruídos frequentemente pela ação de parasitoides, formigas legionárias e outros. Se os indivíduos estivessem determinados a realizar uma tarefa específica a colônia poderia colapsar, uma vez que não teria a capacidade de substituir a perda de operárias ou as rainhas, até uma nova geração de indivíduos emergir.

Figura 14. Grau de desenvolvimento dos ovários e idade das rainhas “originais” (ROrg), rainhas novas (RN), e operárias que foram observadas em posição de ovipositar (P) após a remoção das rainhas “originais” nas colônias Mt-3A de *Metapolybia servilis* (A), Pp-1 de *Protopolybia picteti* (B), Cc-1 de *Chartergellus communis* (C), Cg-2 de *C. golfitensis* (D), e Cg-3 de *C. golfitensis* (E). As cores representam a idade das fêmeas (MC para indivíduos jovens, PG para os mais velhos; ver figura 7). Os códigos entre parêntesis no eixo horizontal representam o

estado de desenvolvimento dos ovários (ver figura 6).

Tabela 10. Quantidade de intermediárias em colônias de *Chartergellus* estudadas até o momento.

Espécie e autor	Quantidade de intermediárias	Total de indivíduos na colônia
<i>Chartergellus communis</i>, Mateus et al. (1997)	Colônia I= 2	286
	Colônia II= 0	20
	Colônia III= 0	218
	Colônia IV= 0	212
	Colônia V= 1	593
<i>Chartergellus golfitensis</i> Chavarria & West- Eberhard (2010)	0	58
<i>C. communis</i> N-1	2	297

Seleção das rainhas

Nas colônias Mt-2 de *M. miltoni* e Cg-3 de *C. golfitensis* observamos como o número de rainhas diminuiu em relação ao número original. Como mencionado na seção “Estabelecimento de rainhas”, na colônia Mt-2 o número de rainhas diminuiu até cinco, e na colônia Cg-3 a quantidade de rainhas diminuiu até a metade. Segundo West-Eberhard (1978: *M. aztecoides*) e Nascimento et al. (2004: *A. ujhelyii*) as rainhas que respondem de forma submissa diante dos comportamentos de teste das operárias, ou de outras rainhas, são expulsas da colônia ou se tornam operárias. Por outro lado, Mateus (2005: *P. fraternus*) e Herman et al. (2000: *P. coleobopterus*) não observaram as rainhas tornarem-se operárias, e não foram observados comportamentos de teste prévios nos casos em que as operárias agrediram as rainhas. Mesmo assim, parece que em *Parachartergus* as operárias selecionam as rainhas por meio de comportamentos agressivos (Herman et al., 2000; Platt et al., 2004; Mateus, 2005). Pelos resultados obtidos nos estudos apresentandos, nesta seção serão analisados os

comportamentos das rainhas que foram eliminadas e das rainhas que foram selecionadas, para determinar se aquelas fêmeas que responderam submissivamente frente aos comportamentos de teste não foram favorecidas para ficar na colônia, enquanto aquelas que responderam de forma dominante sim.

Quando começaram as observações (Outubro) da colônia Mt-2 de *M. miltoni*, havia 19 potenciais rainhas no ninho. Entretanto, após a seleção (Dezembro), somente foram observadas cinco fêmeas botando ovos (I03, I28, I32, I36, I37). Consideramos estas cinco fêmeas como as rainhas “selecionadas” e o restante como potenciais rainhas. Não encontramos diferenças significativas dos comportamentos de dominância feitos pelas potenciais rainhas e as rainhas “selecionadas”. No caso do *display* de dominância *bending display* tipo I (BD1), observamos que todas as fêmeas realizaram o comportamento com frequência similar (Friedman ANOVA: $\chi^2=22,036$ gl=14 $p=0,078$), ou seja, nenhuma das rainhas “selecionadas” se comportou de forma mais dominante que as rainhas que foram eliminadas. Adicionalmente, somente uma (I37) das três rainhas que fizeram mais o BD1 (I37, I01 e I33) não foi eliminada (Fig. 15-A). Da mesma forma que o BD1, as rainhas “selecionadas” não investiram (Inv) com mais frequência do que as rainhas “eliminadas” (Friedman ANOVA: $\chi^2=19,133$ gl=13 $p=0,119$). Mesmo quando não houve diferença significativa na frequência de Inv, as duas rainhas que fizeram mais este comportamento (I03, I37) não foram eliminadas (Fig. 15-B).

As operárias realizaram o *worker dance* com frequência similar para as rainhas “selecionadas” do que para as rainhas “eliminadas” (Friedman ANOVA: $\chi^2=4,238$ gl=8 $p=0,835$). Mesmo quando a rainha I36 foi a fêmea que mais recebeu *worker dance*, não foi eliminada da colônia (Fig. 15-C). Não é claro porque essa fêmea não foi eliminada, uma vez que, diferente do observado por West-Eberhard (1978) e Nascimento (2004), quando recebeu o *worker dance* respondeu tanto de forma dominante (NR=não responde) como submissa (DV= desviar, TTX= regurgitar); por outro lado, a rainha I10

que sempre respondeu de forma dominante foi eliminada (Fig. 16-C). Igualmente, quando I36 e I37 receberam o *bending display* (RBD1), elas responderam de forma mais submissa (DV) que dominante, e não foram eliminadas (Fig. 16-A); as outras rainhas selecionadas (I03, I28 e I32) responderam de forma dominante frente a RBD1 (Fig. 16-A). De qualquer forma, nenhuma das potenciais rainhas recebeu o *bending display* I (RBD1) (Friedman ANOVA: $\chi^2=23,056$ gl=14 $p=0,059$) nem foi investida (SInv) (Friedman ANOVA: $\chi^2=11,678$ gl=13 $p=0,554$) com mais frequência que as rainhas “selecionadas” (Fig. 15-D e Fig. 15-E). Uma das rainhas (I26) que respondeu de forma mais dominante frente à investida (SInv) foi eliminada da colônia (Fig. 16-B). Parece que a postura também não foi um fator determinante na seleção das rainhas, uma vez que as rainhas “selecionadas” (com exceção de I28) botaram em média a mesma quantidade de ovos que as rainhas “eliminadas” (Fig. 15-F) (Friedman ANOVA: $\chi^2=9,792$ gl=14 $p=0,777$).

Semelhantemente, na colônia Cg-3 de *C. golfitensis* não encontramos diferenças significativas dos comportamentos de *display* feitos e recebidos pelas potenciais rainhas. Depois da eliminação das rainhas “originais”, 13 fêmeas foram observadas botando ovos, mas somente sete foram observadas na colônia quando as observações acabaram (V65, N17, N18, N19, N21, N23, N28), enquanto seis foram eliminadas (N16, V74, N20, N22, V91). As rainhas que foram eliminadas fizeram o comportamento de BD1 com frequência similar às rainhas não eliminadas (Friedman ANOVA: $\chi^2=10,496$ gl=10 $p=0,398$) (Fig. 17-A). Quando as rainhas selecionadas receberam BD1 não responderam de forma dominante (DV), em relação à rainha V74 que foi eliminada; das rainhas selecionadas somente a N21 foi observada respondendo de forma dominante (NR, Fig. 18-A). As rainhas eliminadas também não receberam o *worker dance* com maior frequência que as rainhas selecionadas (Friedman ANOVA: $\chi^2=3,201$ gl=5 $p=0,669$) (Fig. 17-B), entretanto as rainhas que foram selecionadas responderam de

forma mais dominante (NR) frente ao *worker dance* que a rainha V74 que foi eliminada (Fig. 18-B).

Figura 15. Frequência média dos comportamentos *display* realizados e recebidos pelas rainhas, e da oviposição na colônia Mt-2 de *Metapolybia miltoni* durante as semanas de observação antes da seleção. Os quadros representam a média e as barras o desvio padrão. A) Frequência média do comportamento *bending display* tipo I (BD1); B) frequência média do comportamento

investir (Inv); C) frequência média com que as rainhas receberam o comportamento *worker dance* (RWD); D) frequência média com que as rainhas receberam o comportamento *bending display* tipo I (RBD1); E) frequência média com que as rainhas foram investidas (SInv); F) frequência média da postura de ovos (OV).

Figura 16. Resposta das rainhas frente aos comportamentos de teste realizados por outras fêmeas na colônia Mt-2 de *Metapolybia miltoni*. A) Resposta das rainhas quando receberam o comportamento de *bending display* tipo I (RBD1), B) resposta das rainhas frente ao comportamento sendo investida (SInv), C) resposta das rainhas frente ao comportamento de *worker dance* (RWD). Dv= desviar, NR= não responde, ANT= antenar, BD= *bending display*, TTX= regurgitar.

Por outro lado, diferente do observado na colônia Mt-2 de *M. miltoni* parece que as rainhas “selecionadas” ovipositaram em média mais ovos que as rainhas “eliminadas” (Friedman ANOVA: $\chi^2=33,109$ gl=10 $p<0,001$) uma vez que foram encontradas diferenças significativas na média de postura entre as rainhas (Fig. 17-C). Como consequência, a postura pode ter sido um fator determinante na seleção das novas rainhas em *Chartergellus*, uma vez que os comportamentos de *display* não foram observadas com muita frequência (como será explicado em “Comportamentos associados ao processo de seleção”).

Figura 17. Frequência média dos comportamentos *display* feitos e recebidos pelas rainhas selecionadas (V65, N17, N18, N19, N21, N23, N28) e eliminadas (N16, V74, N20, N22, V91), e da oviposição na colônia Cg-3 de *Chartergellus golfitensis* durante as semanas de observação

após a eliminação das rainhas “originais”. Os quadros representam a média e as barras o desvio padrão. A) Frequência média do comportamento *bending display* tipo I; B) frequência média com que as rainhas receberam o comportamento *worker dance*; C) frequência média da postura de ovos.

Figura 18. Resposta das rainhas selecionadas (V65, N17, N18, N21, N23) e eliminadas (V74), frente aos comportamentos de teste feitos por outras fêmeas na colônia Cg-3 de *Chartergellus golfitensis*. A) Resposta das rainhas quando receberam o comportamento de *bending display* tipo I (RBD1) B) resposta das rainhas frente ao comportamento *worker dance* (RWD). Dv= desviar, NR= não responde.

Como a determinação de castas em algumas vespas sociais é imaginal, tem sido argumentado que o mecanismo para limitar o desenvolvimento de ovários nos Epiponini é mediante comportamentos agressivos (West-Eberhard, 1978; Spradbery, 1991; Strassmann et al., 2002; Herman et al., 2000). Entretanto, em algumas vespas com determinação imaginal (*Myschocyttarus*, algumas espécies de *Ropalidia*) as relações entre as fêmeas são pacíficas durante a maior parte do ciclo e também durante a

substituição da rainha (Spradbery, 1991). Por exemplo, em *Myschocyttarus* os comportamentos de dominância e agressivos são raros ou ausentes (Spradbery, 1991); da mesma forma em *Ropalidia marginata* as rainhas não são dominantes nem utilizam a agressão física para impedir a reprodução das operárias; parece que mecanismos não comportamentais (como regulação por meio de hormônios ou sinalização química) são utilizados para regular a reprodução (Deshpande et al., 2006).

No caso de *M. miltoni* e *C. golfitensis* não observamos comportamentos agressivos por parte das operárias contra as rainhas que não responderam dominantemente frente aos testes, mas houve uma tendência (não significativa) das operárias selecionar aquelas fêmeas que responderam de forma dominante. Em *M. miltoni* parece que durante a fase de seleção os testes entre rainhas (BD1) são feitos com mais frequência do que os testes das operárias (RWD) (ver “Comportamentos associados ao processo de seleção”). É possível que durante esta fase, os testes das rainhas fossem utilizados pelas fêmeas para selecionar quais reprodutoras se estabeleceriam na colônia; por exemplo, três das cinco rainhas que foram selecionadas responderam de forma dominante (I03, I28 e I32) frente ao BD1 de outras rainhas. As rainhas selecionadas I36 e I37 foram observadas poucas vezes na parte aberta do ninho, e mesmo assim I37 foi uma das fêmeas que mais fez o comportamento de *Inv.* Por outro lado, embora em *C. golfitensis* houve menos interação entre as fêmeas, as rainhas que foram selecionadas responderam de forma dominante ao *worker dance*, mas também ovipositaram mais do que as rainhas eliminadas. Neste caso parece que as operárias selecionam as fêmeas que tem um potencial reprodutivo maior, uma vez que os testes por parte de outras fêmeas são raros.

Possivelmente nas colônias observadas não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para algumas das tendências comportamentais observadas, porque em alguns casos a amostra para cada rainha foi baixa ($N \leq 10$) uma vez que

algumas fêmeas raramente eram observadas na parte aberta do ninho. Mesmo assim, observamos que durante a seleção, a resposta das rainhas ante os comportamentos de teste, e a postura de ovos são utilizadas pela operárias para determinar que fêmeas continuariam dentro das colônias.

Entretanto, diferente do observado em estudos anteriores (onde os comportamentos ritualizados também são utilizados pelas fêmeas), a resposta submissa aos testes não gerou comportamentos agressivos por parte das operárias contra as potenciais rainhas (West-Eberhard, 1978; Nascimento et al., 2004). As fêmeas das colônias observadas também não utilizaram comportamentos agressivos para selecionar as rainhas, diferente do observado em *Parachartergus* (Mateus, 2005; Platt et al. 2004) e *C. communis* (ver “Comportamentos associados ao processo de seleção”). Como será discutido em “Evolução do processo de seleção” possivelmente os comportamentos ritualizados junto com a sinalização química são utilizados nos Epiponini em vez dos comportamentos agressivos, como sinais “honestos” (Hart, Ratnieks, 2005) do seu potencial reprodutivo para evitar conflitos dentro das colônias. Os comportamentos agressivos implicam um maior gasto de energia (Downing, 1991), além de gerar instabilidade, que conseqüentemente poderia diminuir a produtividade da colônia (Hart, Ratnieks, 2005).

D- COMPORTAMENTOS ASSOCIADOS AO PROCESSO DE SELEÇÃO

Metapolybia

Os comportamentos de *display* tiveram tendência a aumentar com o aumento no número de rainhas (com exceção do *worker dance*) na colônia Mt-2 de *M. miltoni* (Fig.

19-A). Por exemplo, a quantidade de fêmeas que executaram o *bending display* I incrementou-se durante a fase de seleção (Novembro-Dezembro) e depois da remoção das rainhas (Fevereiro II) (Fig. 19-A). A frequência com que as rainhas fizeram o comportamento *BD1* também foi maior durante a seleção ($\chi^2=40,289$ gl=1 $p<0,0001$) (Fig. 19-Aii). Mesmo quando a frequência do *BD1* foi significativamente maior durante a fase de seleção, a frequência também foi alta após a seleção, principalmente durante a semana de Fevereiro I quando a frequência do *worker dance* (RWD) e do comportamento morder (SM) também aumentou. Provavelmente os comportamentos de *display* também foram observados com frequência após a redução do número de rainhas, porque a colônia ainda podia estar passando por um processo de seleção. Adicionalmente, o comportamento de *Inv* (investir) também foi feito com maior frequência durante a fase de seleção ($\chi^2= 30,688$ gl=1 $p<0,0001$) (Fig. 19-A). Após a eliminação das rainhas (Fevereiro II) a frequência dos comportamentos *display* diminuiu bastante; comportamentos agressivos (SM) foram observados uma semana depois da eliminação (Fevereiro III). A frequência dos *displays* aumentou de novo durante a última semana de observações (Fevereiro IV) quando a quantidade de “novas” rainhas começou a aumentar. O *bending display* I foi o comportamento de *display* feito com maior frequência pelas rainhas da colônia Mt-2 (Fig. 19-A).

Na semana seguinte à eliminação das rainhas “originais” (N=6) na colônia Mt-3A de *M. servilis*, 41 fêmeas foram observadas realizando *bending display* tipo I (BD1) e II (BD2). No total foram observados 53 indivíduos realizando os comportamentos *BD1* e *BD2*, ou seja o número de fêmeas que fizeram *displays* aumentou nove vezes em relação com o número inicial, indicando que um novo processo de seleção estava começando. Da mesma forma que na colônia Mt-2, o aumento no número de fêmeas que realizam comportamentos *display* parece estar relacionado ao processo de seleção rainhas (Fig. 19-B). A frequência com que as rainhas fizeram o *BD1* também foi maior

depois da eliminação da rainha ($\chi^2=15,500$ gl=1 $p<0.0001$). Das 30 fêmeas que foram coletadas realizando o *BD1* somente quatro não eram rainhas (tinham a espermateca vazia e o estado de desenvolvimento dos ovários era tipo M1 e M2). Este resultado mostra que algumas operárias, da mesma forma que as rainhas, podem fazer o *bending display I* durante a fase de seleção.

Na colônia Mt-3B de *M. servilis*, diferente do observado nas colônias Mt-2 e Mt-3A, a quantidade de “novas” rainhas não aumentou após a eliminação das rainhas “originais” (Fig.19-C). Mesmo quando a quantidade de fêmeas que fizeram o *BD1* após a eliminação não aumentou, a frequência com que fizeram o *bending display I* aumentou (Fig.19-C) ($\chi^2=82,079$ gl=1 $p<0,0001$). Entretanto, o processo de seleção na colônia Mt-3B não foi observado em sua totalidade porque a colônia enxameou. O comportamento de investir (*Inv*) foi pouco utilizado pelas rainhas das colônias Mt-3A (N=2) e Mt-3B (N=1), diferente do observado na colônia Mt-2 (N=62).

Em relação aos outros comportamentos, o *worker dance* (RWD), diferente de *BD1*, foi feito com mais frequência pelas operárias da colônia Mt-2 de *M. miltioni* após o período de seleção (Janeiro e Fevereiro I) ($\chi^2=67,965$ gl=1 $p<0,0001$), e na colônia Mt-3A de *M. servilis* antes da eliminação das rainhas “originais” (Fig. 19-A,B) ($\chi^2=141,638$ gl=1 $p<0,0001$), quando o número de rainhas foi estável em ambas colônias. Por outro lado, na colônia Mt-3B o *worker dance* (da mesma forma que o *BD1*) foi feito com mais frequência após a eliminação da rainha ($\chi^2=43,623$ gl=1 $p<0,0001$) (Fig. 19-C).

Adicionalmente, as rainhas da colônia Mt-3A também foram observadas fazendo o comportamento “*Group*” duas semanas após da eliminação das “rainhas originais”. Durante o *Group* as rainhas foram observadas em grupo muito próximas entre elas. Diferente do observado para outras espécies onde as rainhas ficam quietas em cantos do ninho, as rainhas de Mt-3A moviam-se umas contra as outras empurrando levemente aquela que estava ao lado.

Aparentemente na colônia Mt-2 de *M. miltoni*, quando a quantidade de rainhas era maior (Novembro-Dezembro), o *bending display* I podia ser utilizado pelas potenciais rainhas para testar a capacidade reprodutiva de outras rainhas, uma vez que foi feito com maior frequência entre rainhas do que entre rainhas e operárias ($\chi^2=27,862$ gl=4 $p<0,0001$) (Fig. 20). É possível que durante a fase de seleção, quando há maior quantidade de potenciais rainhas na colônia, são as rainhas (e não as operárias) as encarregadas de testar a capacidade reprodutiva de outras fêmeas. No entanto, quando a quantidade de potenciais rainhas diminui (Janeiro e Fevereiro I) parece que são as operárias as encarregadas de testar as rainhas, uma vez que o *worker dance* foi realizado com maior frequência quando o número de rainhas foi menor (Fig. 19-Aii). Adicionalmente, o *BD1* foi realizado com maior frequência das rainhas para as operárias ($\chi^2=32,500$ gl=1 $p<0,0001$) quando o *worker dance* aumentou (Fig. 20-A). Da mesma forma, nas colônias de *M. servilis* o *bending display* I foi feito com maior frequência das rainhas para as operárias (Mt-3A $\chi^2=210,865$ gl=1 $p<0,0001$; Mt-3B $\chi^2=49,985$ gl=1 $p<0,0001$) (Fig. 20-B,C), possivelmente porque o *BD1* é utilizado como *display* de dominância das rainhas para operárias, e não de teste entre rainhas. Neste caso, parece que as operárias testam constantemente as rainhas pelo *worker dance*, e as rainhas devem exibir constantemente para as operárias sua capacidade reprodutiva por meio do *bending display* tipo I.

Evidentemente há diferenças na forma que rainhas e operárias realizam os comportamentos de *display* entre as colônias de *Metapolybia*. Entretanto, parece que o *bending display* tipo I é realizado com maior frequência quando o número de fêmeas que botam ovos aumenta exponencialmente de poucas a muitas (entre Novembro II e Novembro IV em Mt-2, e após a eliminação das rainhas em Mt-3A e Mt-3B); mas quando a quantidade de “novas” rainhas estabiliza-se (não aumenta exponencialmente) a frequência do *BD1* diminui (Fig. 19). Como mencionado anteriormente, no caso da

colônia Mt-2 o aumento da frequência do *BD1* após a seleção (Fevereiro I) pode estar relacionado com o aumento do *worker dance*, uma vez que a colônia ainda podia estar passando por uma fase de seleção. Mesmo assim, com os resultados obtidos podemos concluir que o *bending display* I e o *worker dance* são comportamentos importantes dentro do processo de seleção nas colônias de *Metapolybia* (Fig. 19), assim como sugerido anteriormente por West-Eberhard (1978). O *BD1*, tanto como *display* de dominância ou comportamento de teste entre rainhas, é muito mais utilizado pelas rainhas do que outros comportamentos *display* como investir (Inv), e comportamentos agressivos como morder (M, SM).

Figura 19. Comportamentos de *display* e teste realizados pelas rainhas das colônias de *Metapolybia* durante o período de observação (barra indica período de seleção, seta indica a eliminação da rainha) em relação à quantidade de rainhas. A) Mt-2= *Metapolybia miltoni*. **Ai** representa as frequências dos comportamentos sem correção, **Aii**, as frequências corrigidas

pela quantidade de rainhas e o tempo de observação. B) Mt-3A= *Metapolybia servilis* 2011. **Bi** frequência sem correção, **Bii** frequência corrigida. C) Mt-3B= *M. servilis* 2012. **Ci** frequência sem correção, **Cii** frequência corrigida. BD1= *bending display* I, BD2= *bending display* II, RBD1= recebe *bending display* I, RWD= recebe *worker dance*, Inv= Investir, SInv= sendo investida, SDv= causar desvio, M= morder, SM= sendo mordida.

Figura 20. Comportamentos de *display* realizados entre rainhas e entre rainhas e operárias durante o período de observação da colônia de Mt-2 de *Metapolybia miltoni*. BD1 R-O= *bending display* tipo I entre rainhas e operárias; BD1 R-R= *bending display* tipo I entre rainhas; RBD1 R-O= quando as rainhas recebem o *bending display* tipo I de operárias; RBD1 R-R= quando as rainhas recebem o *bending display* tipo I de outras rainhas; Inv R-O= investida entre rainhas e

operárias; Inv R-R= investida entre rainhas.

Chartergellus

Durante a fase monogínica da colônia Cc-1 de *C. communis*, a única rainha da colônia (R03) foi observada realizando os comportamentos de *bending display* I (*BD1*) e de investir (*Inv*) (Fig. 21-A). As semanas onde o comportamento *Inv* foi observado com maior frequência (Maio III e Junho I) ($\chi^2=23,077$ gl=9 $p<0,05$) coincidem com as duas semanas que a rainha realizou vigilância de célula após a postura (V) mais vezes. É possível que durante as semanas de Maio III e Junho I algumas fêmeas estivessem tentando atingir o status de rainha e, por esse motivo, a rainha R03 foi observada fazendo *Inv* possivelmente como *display* de dominância para manter seu status. O comportamento *BD1* também foi utilizado pela rainha possivelmente como *display* de dominância, uma vez que foi feito em diferentes fases do ciclo colonial e não somente durante as fases de seleção (Fig. 21-A).

Semelhante ao observado em *Metapolybia*, após a remoção da rainha R03 outras fêmeas foram observadas fazendo o *BD1*, embora outros comportamentos de *display* também foram feitos, mas com menor frequência (Fig. 21-A). Adicionalmente, a quantidade de agressões (M, SM e SInv) também aumentou após a remoção da rainha (Fig. 21-A). Comportamentos agressivos foram feitos contra as potenciais rainhas e fêmeas não reprodutoras que possivelmente tentavam atingir o status. Por exemplo, seis fêmeas foram observadas tentando se proteger em cantos externos, adjacentes ao ninho (Fig. 22), ou tentando ingressar na colônia, mas sendo impedidas por outras fêmeas. Constatou-se que três das fêmeas que foram expulsas do ninho eram rainhas e três eram fêmeas não reprodutoras. Esses comportamentos agressivos não foram observados antes da eliminação da rainha R03.

De forma semelhante ao observado em *M. servilis*, em *C. communis* o *BD1* é utilizado como um *display* de dominância das rainhas para as operárias, embora sua frequência não aumentou com o aumento no número de rainhas (Fig. 21-Aii) uma vez que apresentou maior frequência quando a colônia teve somente uma rainha ($\chi^2=77,050$ $gl=3$ $p<0,0001$). Semelhante ao observado em *M. miltoni*, *BD1* é exibido ao longo do ciclo colonial (Fig. 21-A). Por outro lado, diferente do observado em *Metapolybia*, as operárias não fizeram o *worker dance* para as rainhas durante o processo de seleção nem em nenhuma das fases do ciclo colonial; ao invés disso, as operárias evitavam as rainhas (SDv) e interagiam pouco com elas (Fig. 10-A e Fig. 21-A). O aumento na quantidade de comportamentos agressivos mostra que possivelmente não existe tanta tolerância entre as fêmeas de *C. communis* para reprodução sob condições onde a rainha é ausente, mas sim uma competição para determinar quais fêmeas vão se estabelecer como rainhas. Da mesma forma que em *Metapolybia*, as operárias desempenham um papel muito importante durante o processo de seleção: elas não testam a capacidade reprodutiva das rainhas pelo *worker dance*, mas sim através de comportamentos agressivos para selecionar quais das potenciais reprodutoras continuariam ou não no ninho.

Diferente do observado em *C. communis*, na colônia Cg-2 de *C. golfitensis* após a eliminação da rainha (Maio I) não foi observado um aumento dos comportamentos agressivos por parte das operárias (SM N=2). Embora foi detectado um leve aumento do comportamento *BD1* após a remoção da rainha (Fig. 21-Bi), a frequência de *BD1* não aumentou simultaneamente com o aumento no número de “novas” rainhas (Fig. 21-Bii). Não encontramos diferenças significativas entre a frequência que *BD1* foi feito pela rainha “original” e pelas “novas” rainhas ($\chi^2=0,947$ $gl=1$ $p=0,330$) (Fig. 21-Bii). Mesmo assim, a quantidade de comportamentos de *display* e de testes observados na colônia foi no geral muito reduzida (Fig. 21-B). Por outro lado, os comportamentos de interação

entre rainhas e operárias (SDv, Inv, SInv) diminuíram após a remoção da rainha “original” (Fig. 21-Bii) (SDv $\chi^2=62,403$ gl=1 $p<0,0001$; Inv $\chi^2=10,180$ gl=1 $p<0,05$; SInv $\chi^2=20,108$ gl=1 $p<0,0001$). Da mesma forma que na colônia Cc-1, as operárias não foram observadas fazendo o *worker dance*.

Na colônia Cg-3 de *C. golfitensis* o *BD1* foi observado somente após a remoção das rainhas “originais”. Entretanto, da mesma forma que em Cg-2, a frequência não foi muito alta (Fig. 21-C). Diferente das colônias Cc-1 e Cg-2 as operárias da colônia Cg-3 foram observadas fazendo o *worker dance* após a remoção das rainhas “originais”; mesmo assim interagiram pouco com as rainhas e as evitaram constantemente (SDv). As rainhas também evitavam outras rainhas (Dv) (Fig. 21-C).

Em síntese, da mesma forma que nas colônias de *M. servilis*, em *Chartergellus* o *BD1* provavelmente é utilizado como *display* de dominância e não de teste entre as rainhas, uma vez que foi feito com maior frequência para as operárias (Cg-2 N=20, Cg-3 N=32) do que para outras rainhas (Cg2 N=0, Cg3 N=12) (Cg-3 $\chi^2=7,364$ gl=1 $p<0,05$). No entanto, diferente do observado em *Metapolybia*, as operárias de *Chartergellus* interagiram pouco e evitaram as rainhas (SDv) (Fig. 10-A, Fig.11-A, Fig. 21). A quantidade de fêmeas que fizeram o *bending display* I não aumentou durante a fase seleção (Fig. 21-Aii, Bii, Cii) mesmo quando a quantidade de fêmeas que ovipositou (ou tentou ovipositar) aumentou. Ou seja, diferente do observado em *Metapolybia* parece que a remoção das rainhas não estimulou as fêmeas a executarem o *bending display* I, mas sim a ovipositar.

Possivelmente nas colônias de *Chartergellus* as rainhas fazem o *bending display* I como *display* de dominância para mostrar sua capacidade reprodutiva durante diferentes fases do ciclo e não somente durante a fase de seleção, embora diferente do observado em *Metapolybia* o *BD1* não foi utilizado como comportamento de teste entre rainhas. Parece que nas colônias de *C. golfitensis*, diante da ausência da rainha, as

fêmeas podem ser mais tolerantes à reprodução pelo menos durante as primeiras semanas (Fig. 21-B,C); por outro lado, parece que em *C. communis* existe menos tolerância para reprodução entre as fêmeas durante as etapas iniciais do ciclo, uma vez que foram observados comportamentos agressivos e algumas fêmeas foram expulsas do ninho.

Protopolybia e Polybia

Nas colônias de *Protopolybia*, *worker dance* (WD) foi o comportamento de teste observado com maior frequência (Fig. 10-C) (Pp-1 $\chi^2=974,996$ gl=3 $p<0,0001$; Pe-2 $\chi^2=287,519$ gl=2 $p<0,0001$; Pe-4 $\chi^2=97,906$ gl=1 $p<0,0001$); nas colônias de *Polybia* e *Brachygastra* foi o único comportamento de teste observado (Fig. 10-D); em *Brachygastra* o BD2 foi observado somente uma vez. Quando as rainhas caminhavam pelo ninho as operárias constantemente realizavam o *worker dance* (RWD) para elas (Fig. 10-C,D). Como mencionado na seção “Comportamentos de interação entre rainhas e operárias”, na maior parte do tempo as rainhas não respondiam ao *worker dance*, mas em alguns casos o comportamento era tão intenso que forçava às fêmeas a se afastarem (Dv). Possivelmente as operárias dentro das colônias de *Protopolybia*, *Polybia* e *Brachygastra* interagem mais com as rainhas para testar sua capacidade reprodutiva durante as diferentes das fases do ciclo e não somente durante a fase de seleção. Mesmo assim, o *bending display* I (BD1) foi o comportamento de *display* feito com mais frequência pelas rainhas de *Protopolybia*, *Polybia* e *Brachygastra* (Fig. 10-C,D), outros *displays*, como o comportamento investir (Inv) e o *bending display* II (BD2) foram observados poucas vezes dentro das colônias (Fig. 10-C,D). Diferente do observado em *Metapolybia*, o BD2 não foi observado após a remoção das rainhas em *Protopolybia* (Fig. 23-A).

Figura 21. Comportamentos de *display* e teste realizados pelas rainhas das colônias de *Chartergellus* durante o período de observação em relação à quantidade de rainhas (seta indica a eliminação da rainha). A) Cc-1= *Chartergellus communis*. **Ai** representa as frequências dos

comportamentos sem correção; **Aii** representa as frequências corrigidas pela quantidade de rainhas e o tempo de observação. B) Cg-2= *Chartergellus golfitensis*. **Bi** frequência sem correção, **Bii** frequência corrigida. C) Cg-3= *C. golfitensis*. **Ci** frequência sem correção, **Cii** frequência corrigida. BD1= *bending display* I, RWD= recebe *worker dance*, Inv= Investir, SInv= sendo investida, Dv= desvio, SDv= causar desvio, SM= sendo mordida.

Figura 22. Nova rainha de *Chartergellus communis* (seta branca) expulsa da colônia durante o processo de seleção escondida num canto fora do ninho da colônia Cc-1.

O processo de seleção não foi observado em *Polybia* nem *Brachygastra*, como explicado anteriormente, pois as colônias enxamearam antes de se fazer os testes. Em *Protopolybia* a fase de seleção foi observada nas colônias Pp-1 e Pe-4. Da mesma forma que em *Chartergellus*, após a remoção das rainhas “originais” da colônia Pp-1 a frequência do *bending display* I não aumentou (Fig. 23-A,C) (Pp-1 $\chi^2=12,881$ gl=1 $p<0,001$); por outro lado, na colônia Pe-4 a frequência do BD1 foi maior após a primeira remoção de rainhas ($\chi^2=12,881$ gl=1 $p<0,001$). Semelhante ao observado em *C.*

communis, houve um aumento dos comportamentos agressivos durante o processo de seleção em *Protopolybia*. Na semana que o *worker dance* (RWD) e a postura de ovos (OV) foram observados com maior frequência, também foi quando as operárias da colônia Pe-2 morderam mais as rainhas (Fig. 23-B). Da mesma forma as operárias da colônia Pe-4 foram observadas mordendo (SM) as potenciais rainhas quando tentavam entrar no ninho. As rainhas da colônia Pe-4, da mesma forma que as rainhas da colônia Mt-3A, foram observadas fazendo o comportamento “*Group*”, principalmente durante as primeiras semanas após a fundação, quando a colônia estava passando por uma fase de seleção.

É possível que nas colônias de *Protopolybia*, *Polybia* e *Brachygastra* as operárias sejam fundamentais na seleção das rainhas. Como mostrado nos resultados, as operárias testam constantemente as rainhas, diferente do observado em *Chartergellus* onde as operárias não interagem constantemente com elas. É possível que os testes sejam feitos constantemente porque, como mencionado anteriormente, as rainhas são testadas ao longo do ciclo, e não especificamente durante uma fase, como nas colônias de *Chartergellus* e *Metapolybia*. Como foi mostrado na seção de “estabelecimento de rainhas”, o número de rainhas nas colônias de *Protopolybia* não mudou muito, nem ao longo do ciclo colonial, nem após a remoção das rainhas; diferente do observado nas colônias de *Chartergellus* e *Metapolybia* onde houve um grande aumento diante da ausência da rainha “original”.

Figura 23. Comportamentos de *display* e teste feitos pelas rainhas das colônias de *Protopolybia* durante o período de observação em relação com a quantidade de rainhas (seta indica a eliminação da rainha). A) Pp-1=*Protopolybia picteti*. **Ai** representa as frequências dos

comportamentos sem correção; **Aii** representa as frequências corrigidas pela quantidade de rainhas e tempo de observação. B) Pe-2= *Protopolybia exigua*. **Bi** frequência sem correção, **Bii** frequência corrigida. C) Pe-4= *P. exigua* N-4. **Ci** frequência sem correção, **Cii** frequência corrigida. BD1= *bending display* I, RBD1= recebe *bending display* I, BD2= *bending display* II, RWD= recebe *worker dance*, SDv= causar desvio, SM= sendo mordida.

Considerações finais sobre o processo de seleção

Em *Metapolybia* e *Chartergellus* há tolerância reprodutiva entre as fêmeas principalmente durante as primeiras fases do ciclo e depois da eliminação da rainha. Por exemplo, o número de rainhas foi maior durante as primeiras fases do ciclo, mas conforme as colônias cresceram o número delas diminuiu. Do mesmo modo, após a remoção da rainha houve um aumento muito grande das fêmeas que tentaram suprir a falta delas, embora o número eventualmente também diminuiu. Diferente de *Metapolybia* e *Chartergellus*, em *Protopolybia* a proporção de rainhas não diminuiu muito após as fases iniciais, e após a eliminação das rainhas o aumento das “potenciais rainhas” não foi tão grande. Em *Protopolybia* e *Chartergellus* há diferentes graus de desenvolvimento dos ovários das operárias, entretanto em *Protopolybia* tem fêmeas tentando ovipositar constantemente e não somente durante as fases iniciais do ciclo.

Como mencionado anteriormente parece que a delimitação de casta nos Epiponini pode ser feita mediante algum tipo de sinalização química por parte das rainhas. A eliminação da(s) rainha(s) estimulou o desenvolvimento de ovários de algumas fêmeas, mas também estimulou o comportamento de ovipositar em outras que apresentavam algum grau de desenvolvimento e que podiam estar limitadas pela presença da(s) rainha(s). Entretanto, diferente do argumentado em estudos anteriores, parece que a plasticidade para desenvolver os ovários não é limitada pela idade das

fêmeas, uma vez que tanto fêmeas velhas como de idade intermediária substituíram a rainha, ativando seus ovários.

É possível que a alta frequência do *worker dance* nas colônias de *Protopolybia* esteja relacionada a pouca variação do número de rainhas durante o ciclo colonial. As operárias provavelmente são observadas fazendo o *worker dance* constantemente (não somente durante as fases iniciais ou de seleção) para testar se as rainhas tem capacidade reprodutiva para garantir a produção de novos indivíduos, durante o curto ciclo colonial que os ninhos tem. Nas espécies de *Polybia* e *Brachygastra* estudadas poderia estar acontecendo algo semelhante, uma vez que os ninhos também tem ciclos coloniais curtos e as operárias foram observadas constantemente fazendo o *worker dance*. Por exemplo, os ninhos de *Polybia occidentalis* segundo Gastreich et al. (1993) são destruídos com frequência; no caso de *Polybia selvana* e *Brachygastra smithii* observamos que geralmente constroem ninhos pequenos, que possivelmente são de pouca duração.

Da mesma forma que em *Metapolybia*, o *display* feito com mais frequência pelas rainhas de *Protopolybia*, *Polybia* e *Brachygastra* foi o *bending display* I (BD1). Entretanto, as rainhas de *Metapolybia* podem usar o BD1 como comportamento de teste entre elas, e não somente como *display* de dominância para as operárias como as vespas do clado de *Polybia*. Em *Metapolybia* os comportamentos de *display* são feitos com maior frequência quando o número de fêmeas que botam ovos aumenta exponencialmente de poucas a muitas, ou seja, durante as fases iniciais ou de seleção, e não constantemente como em *Protopolybia*. A frequência do BD1 foi maior após a remoção da rainha em *Metapolybia* e *P. exigua*, ou seja, a falta da rainha estimulou as fêmeas destas colônias a fazerem o BD1; diferente do observado em *P. picteti* onde não houve um aumento da frequência do BD1. O comportamento de *worker dance* também foi feito constantemente pelas operárias de *Metapolybia*, principalmente nas colônias de

M. servilis.

Por outro lado, em *Chartergellus*, parece que os comportamentos de *display* e teste não são utilizados com muita frequência nem durante as fases iniciais e de seleção, nem durante outras fases do ciclo colonial. As operárias também são as encarregadas de selecionar as rainhas, mas da mesma forma que em *P. exigua* elas expulsam e agredem as “potenciais rainhas” durante o processo de seleção. Diferente do observado em *Protopolybia* e *Metapolybia* as operárias de *Chartergellus* não utilizam o *worker dance* como teste de seleção, uma vez que as operárias interagem pouco com as rainhas. Mesmo quando a remoção das rainhas não estimulou o aumento da frequência dos comportamentos de *display*, ela estimulou a postura. Pelos resultados obtidos, sugere-se que em *Chartergellus* as operárias selecionam as rainhas pelo potencial reprodutivo, e favorecem aquelas fêmeas que botam mais ovos. Em *Metapolybia* parece que a resposta das rainhas aos comportamentos de teste é importante para determinar que fêmeas são mantidas nas colônias. Detalhes sobre a evolução do processo de seleção, e uma análise comparativa entre os diferentes gêneros serão apresentados a seguir.

E- EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE SELEÇÃO E ELIMINAÇÃO DE RAINHAS EM EPIPONINI

A análise combinada dos dados da matriz de Carpenter & Wenzel (1994) com os dados comportamentais aqui obtidos resultou em uma única árvore mais parcimoniosa, com índices de consistência e retenção de 0,58 e 0,54, respectivamente. A topologia dos principais clados (Fig. 24) não foi grandemente diferente do que aquele previamente

conhecido, de modo que se pode dizer que os dados comportamentais corroboraram com a proposta atualmente mais aceita. Sobre essa árvore, foram otimizados apenas os caracteres comportamentais (Fig. 24), que são os de interesse para este trabalho. Pode-se observar que vários desses comportamentos foram sinapomórficos para diferentes clados de Epiponini, o que consequentemente mostra que os dados comportamentais são filogeneticamente informativos.

Com base na otimização do tipo Actran, serão destacados alguns caracteres mais informativos, sendo que as autopomorfias (origens exclusivas para apenas um táxon) não serão discutidas. Pode-se inferir que o comportamento de *bending display* I (BD1, caráter #1, 2) é basal para os Epiponini (Fig. 24), ou seja, todas as rainhas dentro da tribo utilizam este comportamento como *display* de dominância. O *bending display* I feito pelas operárias para as rainhas é uma apomorfia exclusiva da casta operária de *Metapolybia* (Fig. 24 caráter #4). Por outro lado, o *bending display* II (BD2, caráter #5) surgiu no ancestral comum aos clados *Metapolybia* (e demais gêneros desse clado) e *Polybia* (e demais gêneros desse clado) com perda secundária em *Synoeca* e *P. exigua* (Fig. 24). O *bending display* I pode ser um *display* derivado de um comportamento ancestral onde a fêmea reprodutora curvava o gaster para mostrar o ferrão; embora segundo Platt et al. (2004) a exposição do ferrão ainda é observada nas colônias de *P. colobopterus*. Por outro lado, nas espécies estudadas a exposição do ferrão não foi observada durante o *BD1*, ou foi tão leve que nem foi percebida. Como foi observado que durante o *BD1* não há contato direto nem agressão física entre as fêmeas, considerou-se ser um comportamento de *display* ritualizado que as rainhas utilizam para exibir dominância para as operárias, e não um comportamento de dominância agressivo como foi caracterizado por outros autores (West-Eberhard, 1978; Spradbery, 1991; Platt et al., 2004; Nascimento et al., 2004).

Os comportamentos de *worker dance* (RWD, #9), *BD1* feito pelas operárias (#4),

e *BD2* (#5), podem estar relacionados com um aumento na complexidade das interações entre as fêmeas dos clados de *Polybia* e *Metapolybia*. Nestes clados também foi observada uma maior variação da resposta dada pelas rainhas ante os comportamentos de *display* (#24, #32, #33, #46, #50) (Fig. 24). Parece que as relações entre as fêmeas são ainda mais complexas em *Metapolybia*, uma vez que algumas das respostas aos comportamentos de *display* foram observadas somente para este gênero (#25, #26, #35, #38, #41, #42, #43, #48, #51) (Fig. 24). Isto pode estar relacionado com o fato das operárias selecionar aquelas fêmeas que respondem de forma dominante frente aos comportamentos de teste. Como o tipo de resposta é importante durante a seleção, as rainhas podem ter diversificado o comportamento para mostrar por meio de diferentes comportamentos sua capacidade reprodutiva.

Por outro lado, no clado que compreende *Chartergellus* e os gêneros relacionados, o *worker dance* foi observado somente em *C. golfitensis* e com pouca frequência. Nas colônias de *Parachartergus* e *Chartergellus* as operárias quase não interagiram com as fêmeas reprodutoras, possivelmente, por este motivo, os comportamentos de interação observados não foram tão elaborados como nos clados de *Polybia* e *Metapolybia* e os gêneros relacionados. A ausência dos comportamentos *worker dance* e *BD2*, e a ausência de respostas diferentes (como antenar, regurgitar, *bending display* I, levantar abdômen, investir) de NR (#22, #30, #36, #44) e DV (#23, #31, #37, #45, #49) frente aos comportamentos de *display*, mostram que as interações entre as fêmeas do clado de *Chartergellus* são menos elaboradas. Da mesma forma que em *P. fraternus* (Mateus, 2005) e *P. colobopterus* (Herman et al., 2000; Platt et al., 2004), as operárias de *Chartergellus* interagiram principalmente com as rainhas durante as fases de estabelecimento do ninho (seleção) e eliminação, selecionando as novas fêmeas reprodutoras por meio de comportamentos agressivos; entretanto, durante outras fases do ciclo as operárias evitaram as rainhas e interagiram pouco com elas.

Figura 24. Hipótese filogenética da evolução dos caracteres associados ao processo de seleção e eliminação de rainhas para a tribo Epiponini otimizada na árvore proposta por Wenzel e Carpenter (1994) combinada com os dados comportamentais deste trabalho.

Embora o *worker dance* não seja executado pelas operárias de todas as espécies da tribo, ou seja, ele teve um surgimento mais apical (tardio), outros comportamentos de teste como Investir (Inv/O-R, #8) e morder (M, #10) foram basais, sugerindo que os testes das operárias para as rainhas estariam presentes no ancestral dos Epopinini. Por outro lado, o comportamento de investir feito das rainhas para as operárias (Inv/R-O, #6) surgiu independentemente em *Chartergellus*, *Metapolybia* e *Brachygastra*, da mesma forma que o comportamento de investir das rainhas para outras rainhas (Inv/R-R, #7) em *Metapolybia* e *Protopolybia* (Fig. 24). No caso de *Chartergellus* o comportamento de Inv/R-O (#6) é utilizado pelas rainhas como *display* de dominância principalmente nas fases onde tem outras fêmeas tentando botar ovos (Fig. 21), diferente do *BD1* (#1) que é observado em diferentes fase do ciclo colonial. No caso de *Metapolybia* e *Brachygastra* o comportamento Inv/R-O foi observado com menos frequência possivelmente porque as rainhas utilizam com mais frequência o *BD1* (#1) como *display* de dominância. Associado a isso, em *Metapolybia* Inv/R-O foi observado em diferentes fases do ciclo, diferente de *Chartergellus* (Fig. 19). Possivelmente em *Polybia* e *Protopolybia* o comportamento das rainhas investirem contra as operárias (Inv/R-O) não foi observado, porque nessas colônias são as operárias as que testam constantemente as rainhas e não o contrário. Também parece que as rainhas utilizam exclusivamente o *BD1* como *display* de dominância.

O comportamento de remover (Rm #14), embora tenha surgido várias vezes nos três clados estudados, com base na otimização, parece intuitivamente ser um comportamento menos ritualizado, e por este motivo ele que poderia ser um comportamento basal que foi perdido secundariamente em alguns táxons (Fig. 24). O comportamento de lambear o ovo (LOv #15) também foi perdido secundariamente em *Metapolybia* e no clado de *Polybia*. Como mencionado anteriormente, este comportamento pode estar relacionado ao interesse coletivo das fêmeas reprodutoras

pela proteção dos ovos (Mateus, 2005), ou com dominância sendo que as rainhas poderiam lamber o ovo de outras para adicionar alguma substância de reconhecimento.

Os resultados obtidos sobre a evolução dos comportamentos de *display* e dominância apoiam o argumento que as operárias controlam a seleção das rainhas nos Epiponini (West-Eberhard, 1978; Herman et al., 2000; Strassmann et al., 2002; Noll, Wenzel, 2008). Dois dos três comportamentos de teste feitos das operárias para rainhas foram basais para todas as espécies estudadas (#8, #10), indicando que durante a evolução houve uma mudança a partir de um controle reprodutivo feito principalmente pela rainha (vespas primitivamente eussocias) para um controle feito pelas operárias (Noll, Wenzel, 2008). Os resultados mostram que as operárias testam constantemente as rainhas nas colônias dos clados *Metapolybia* e *Polybia*, e no clado *Chartergellus* as operárias selecionam as fêmeas que serão estabelecidas como rainhas dentro do ninho durante as fases de estabelecimento e seleção. Segundo Noll e Wenzel (2008) as rainhas dos Epiponini no geral são tolerantes à reprodução e são as operárias as que limitam outras fêmeas de botar ovos, diferente de *Polistes* onde as operárias são tolerantes, e as rainhas as encarregadas de controlar a reprodução (Spradbery, 1991).

A seleção por parte das operárias faz sentido, porque elas que são maioria dentro da população e controlam todas as atividades do ninho; diferente das rainhas que não são ativas e estão encarregadas quase exclusivamente da reprodução (Naumann, 1970; West-Eberhard, 1977; Forsyth, 1978; Herman et al., 2000; Mateus, 2005; Nascimento et al., 2004; Chavarría, West-Eberhard, 2010). Adicionalmente, dentro das colônias que apresentam muitos indivíduos, deve ser quase impossível para uma ou poucas rainhas controlar diretamente (controle comportamental) a reprodução de todas as fêmeas; em relação às operárias que constantemente monitoram o estado da colônia. Como consequência, as operárias selecionarem as rainhas é mais acessível além de vantajoso, uma vez que durante o processo de seleção elas podem aumentar o

relacionamento genético entre as fêmeas da colônia, favorecendo aquelas reprodutoras que eram parte do grupo original que fundou o ninho (Queller et al., 1993; Strassmann et al., 2002). Isto pode ser uma forma das operárias aumentarem o *fitness* da casta, que é diminuído pelo fato dos indivíduos não se reproduzirem diretamente (Queller et al., 1993, Strassmann et al. 2002; Hart, Ratnieks, 2005).

Os comportamentos de teste entre rainhas, por outro lado, surgiram independentemente em algumas espécies (#5, #7, #14) (Fig. 24). Isto poderia estar relacionado ao aumento da complexidade das interações entre as fêmeas, que desenvolveram comportamentos ritualizados mais elaborados durante o processo de seleção. Em *Metapolybia*, *Protopolybia* e *Brachygastra*, onde há uma maior interação entre os indivíduos, as rainhas testaram a capacidade reprodutiva de outras rainhas (embora com menos frequência que as operárias) pelos comportamentos *BD1* (#2), *BD2* (#5) e *Inv/R-R* (#7). Em *Chartergellus*, *Parachartergus* e *Synoeca* além do *BD1* entre rainhas (#2) também foi utilizado o comportamento *Rm* (#14) e *LOv* (#15) (Fig. 24). Como no clado que *Chartergellus* e os gêneros mais relacionados e em *Synoeca* as fêmeas interagiram pouco entre elas, e é possível que comportamentos mais elaborados como o *BD2* possam não ter sido evolutivamente selecionados. Mesmo assim, os comportamentos de remover (*Rm*) e lambear o ovo (*LOv*) poderiam representar comportamentos iniciais de dominância (menos elaborados) que surgiram entre as rainhas dessas espécies.

Esses resultados mostram que os comportamentos associados ao processo de eliminação de rainhas (principalmente durante a fase de estabelecimento) podem ser agressivos (morder e expulsar) em algumas espécies dos gêneros *Chartergellus*, *Synoeca*, *Parachartergus*, e *P. exigua*; entretanto, durante o restante do ciclo colonial, as relações entre as fêmeas são “amistosas” e estes comportamentos não são observados. Por outro lado, nas espécies de *Metapolybia* e em *P. picteti* não foram

observados comportamentos agressivos durante o processo de seleção e eliminação, mas sim *displays* de dominância entre as fêmeas. As relações entre as fêmeas de *Metapolybia* e das espécies que compõe o clado *Polybia* e gêneros mais relacionados no geral também foram “amistosas”, mesmo quando as operárias testavam as rainhas constantemente através de comportamentos de *display*.

Em outros grupos sociais onde as fêmeas também são capazes de desenvolver ovários, como as vespas do gênero *Myschocyttarus* (Spradbery, 1991) e *Ropalidia marginata* (Deshpande et al., 2006), as formigas do gênero *Dinoponera* (Formicidae: Ponerinae) e as “naked-mole rats” *Heterocephalus glaber* (Rodentia: Bathyergidae), os indivíduos também foram observadas utilizando comportamentos ritualizados (não agressivos) durante a maior parte do ciclo (Hart, Ratnieks, 2005). Por exemplo, em *Dinoponera* tem sido observado tanto comportamentos agressivos como comportamentos ritualizados, embora a fêmea alfa mantenha seu status utilizando comportamentos não agressivos (Hart, Ratnieks, 2005). Em *H. glaber* o comportamento de “shoving”, que é menos agressivo em relação a morder e puxar, é o mais utilizado pela reprodutora para mostrar dominância e manter seu status dentro da colônia (Clarke, Faulkes, 2001). Comportamentos agressivos foram observados somente quando a rainha foi eliminada das colônias de *Dinoponera* e *H. glaber* (Hart, Ratnieks, 2005), semelhante com o observado no clado de *Chartergellus*.

O controle físico por meio de comportamentos agressivos tem a desvantagem que implica em um maior gasto de energia, assim como a perda de indivíduos em caso de morte, e a diminuição da produtividade da colônia (Downing, 1991; Hart, Ratnieks, 2005). Por este motivo, acredita-se que os comportamentos ritualizados assim como a sinalização química são sinais “honestos” para as operárias sobre a capacidade reprodutiva das rainhas, que foram desenvolvidos para evitar conflitos nas sociedades de indivíduos totipotentes (Keller, Noacs, 1993; Hart, Ratnieks, 2005). No caso das

colônias de Epiponini acreditamos que os comportamentos observados durante o processo de seleção como o *BD1*, *BD2* e *RWD* são *displays* ritualizados derivados de sinais honestas, e não comportamentos agressivos para indicar dominância ou testar a capacidade reprodutiva de outras fêmeas.

A totipotencia das fêmeas para desenvolver seus ovários e botar ovos nos Epiponini é limitada a situações em que a rainha é ausente, uma vez que o aumento na quantidade de fêmeas que botam ovos após a remoção da rainha (#20) é basal para a tribo (Fig. 24). Por exemplo, no clado que compreende *Chartergellus* e os gêneros mais relacionados e no gênero *Metapolybia* outras fêmeas tentaram botar ovos somente durante a fase de seleção (ou estabelecimento) ou frente a ausência da rainha (#18) (Fig. 24). Ou seja, parece que no ancestral comum dos Epiponini as fêmeas também eram totipotentes e podiam desenvolver seus ovários.

Além do controle reprodutivo feito constantemente pelas operárias, parece que tem algum tipo de sinalização química em algumas espécies que limita o desenvolvimento de ovários quando a(s) rainha(s) está(ão) presente(s). Sinalização química ou feromonal refere-se quando os feromonios são utilizados pelas operárias como um sinal da presença da rainha na colônia, mas não como mecanismo de controle por parte das rainhas. Por outro lado controle feromonal refere-se quando a rainha manipula e/ou controla as operárias quimicamente para impedir sua reprodução (Keller, Noacs, 1993). Possivelmente nos Epiponini não há um controle químico (que impede o desenvolvimento de ovários) uma vez que dentro das colônias de *Chartergellus*, *Parachartergus*, *Polybia*, *Protopolybia* e *Brachygastra* há fêmeas com diferentes graus de desenvolvimento ovariano. Se dentro das colônias dos Epiponini houvesse algum controle químico para limitar o desenvolvimento, provavelmente não haveria intermediárias, e outras fêmeas não seriam observadas tentando ovipositar constantemente como nas espécies do clado que compreende *Polybia* e demais

gêneros mais proximamente relacionados (#17) (Fig. 24). É mais provável que as rainhas tenham algum odor característico (sinal químico) que as identifica e permita as operárias saberem quando estão presentes (Keller, Noacs, 1993).

Além da totipotência reprodutiva, a flexibilidade das rainhas trabalharem em determinadas situações (#16) também é basal nos Epiponini, com uma perda secundária para algumas espécies de *Parachartergus*, *Asteloeca*, *Brachygastra* e *Protopolybia* (Fig. 24). Como mencionado anteriormente, as rainhas “trabalhadoras” poderiam ser operárias colaborando com a reprodução, mas que continuam realizando as tarefas; ou poderiam ser rainhas que ajudam nas tarefas frente a falta de operárias para manter as necessidades da colônia. De qualquer forma, como argumentado anteriormente, a flexibilidade de casta é um traço muito importante para a sobrevivência da colônia durante um enxame (de fuga ou reprodutivo), ou para responder à falta de indivíduos para realizar tarefas (West-Eberhard, 1982; Karsai, Wenzel 2000; Sendova-Franks, Franks 1999; Beshers, Fewell 2001; Nowak et al., 2010).

Conclusões

- ⇒ O comportamento de *bending display* I deve ter surgido no ancestral comum dos Epiponini.
- ⇒ Os comportamentos de teste entre rainhas surgiram independentemente em algumas espécies, indicando que poderiam estar relacionados com um aumento da complexidade das interações entre as fêmeas.
- ⇒ A resposta das rainhas aos comportamentos de teste, e a postura de ovos são possivelmente utilizadas pelas operárias para determinar que fêmeas devam continuar

nas colônias.

- ⇒ As relações entre as fêmeas de *Metapolybia* parecem ser mais complexas, porque há várias sinapomorfias comportamentais de *display* e das respostas que os indivíduos executam.
- ⇒ Os testes das operárias contra as rainhas estariam presentes no ancestral dos Epiponini indicando que as operárias controlam a seleção das rainhas.
- ⇒ No geral, as rainhas e operárias de *Chartergellus* interagiram pouco entre elas e, por este motivo, possivelmente não se identificaram comportamentos de interação mais elaborados.
- ⇒ Remover *Rm* e lambar o ovo *LOv*, poderiam representar comportamentos menos elaborados de dominância que surgiram de forma mais basal, como entre as rainhas de *Chartergellus*, *Parachartergus* e *Synoeca*, tendo sido perdidos posteriormente em clados mais apicais.
- ⇒ A totipotência das fêmeas para desenvolver seus ovários e botar ovos frente à ausência da rainha é basal para os Epiponini.
- ⇒ Tanto as operárias e intermediárias jovens, como as de idade intermédia e velhas podem desenvolver seus ovários frente à ausência da rainha.
- ⇒ Comportamentos ritualizados de dominância e de teste são utilizados como sinais honestos do potencial reprodutivo das fêmeas em vez de comportamentos agressivos.

Referências

Amorim DS. Fundamentos de Sistemática Filogenética. Ribeirão Preto: Holos Editora; 2002. p. 154.

Andena S, Carpenter J. A New Species of *Metapolybia* (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini). *Entomologica Americana*. 2011;117(3):117–20.

Baio MV. Diferenciação de castas e aspectos relacionados ao ciclo colonial de algumas vespas do Brasil. (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras; 2002.

Baio M, Noll F, Zucchi R. Shape differences rather than size differences between castes in the neotropical swarm founding wasp *Metapolybia docilis* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *BMC Evolutionary Biology*. 2003 May 13;3:10.

Beshers SN, Fewell JH. Models of division of labor in social insects. *Annual review of entomology*. 2001 Jan;46:413–40.

Bourke A. Colony size, social complexity and reproductive conflict in social insects. *Journal of Evolutionary Biology*. 1999;12:245–57.

Carpenter JM. Phylogenetic Relationships and the origin of social behavior in the Vespidae. In: Ross KG, Matthews RW, editores. *The social biology of wasps*. Ithaca: Cornell University; 1991. p. 7-29.

Carpenter J, Kojima J. A new species of paper wasp from Costa Rica (Hymenoptera: Vespidae; Polistinae, Epiponini). *Journal of the New York Entomological Society*. 2002;110(2):212–23.

Chavarría L. Comportamento, atividade e interações sociais entre rainhas e operárias

de *Metapolybia docilis* (Vespidae: Polistinae: Epiponini) [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras; 2009.

Chavarría L, West-Eberhard MJ. The behavior and natural history of *Chartergellus*, a little-known genus of neotropical social wasps (Vespidae Polistinae Epiponini). *Ethology Ecology & Evolution*. 2010 Nov 10;22(4):317–43.

Clarke FM, Faulkes CC. Intracolony aggression in the eusocial naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*. *Animal Behavior*. 2001;61: 311–324.

Deshpande SA, Sumana A, Suberck M, Gadagkar R. Wasp who would be queen: A comparative study of two primitively eusocial species. *Current Science*. 2006;91(3):332–6.

Downing HA, Jeanne RL. Correlation of season and dominance status with activity of exocrine glands in *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). *Jour. Kansas Entomol. Soc.* 1983;56: 387-397.

Downing HA. The function and evolution of exocrine glands. In: Ross KG, Matthews RW, editores. *The social biology of wasps*. Ithaca: Cornell University; 1991. p. 7-29.

Fletcher D, Ross K. Regulation of reproduction in eusocial Hymenoptera. *Annual review of Entomology*. 1985;(175):319-343.

Forsyth, A. B. *Studies on the behavioral ecology of polygynous social wasps* [tese]. Boston: Harvard University; 1978.

Gastreich K, Strassmann J, Queller D. Determinants of high genetic relatedness in the swarm-founding wasp, *Protopolybia exigua*. *Ethology Ecology & Evolution*. 1993;5:529–39.

Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*. 2008;(24):774-786.

- Hanson P, Gauld ID. Hymenoptera de la Región Neotropical. Florida: Memoirs of the American Entomological Institute; 2006. Capítulo 15: Familia Vespidae; p. 1-997.
- Hart AG, Ratnieks FLW. Crossing the taxonomic divide: conflict and its resolution in societies of reproductively totipotent individuals. *Journal of evolutionary biology*. 2005 Mar;18(2):383–95.
- Hastings M, Queller D, Eischen F, Strassmann J. Kin selection, relatedness, and worker control of reproduction in a large-colony epiponine wasp, *Brachygastra mellifica*. *Behavioral Ecology*. 1998 Dec 25;9(6):573–81.
- Herman R, Queller D, Strassmann J. The role of queens in colonies of the swarm-founding wasp *Parachartergus colobopterus*. *Animal behaviour*. 2000 Apr;59(4):841–8.
- Hennig W. *Phylogenetic Systematics*. Chicago: Univ. Ill. Press; 1996.
- Hunt JH, Jeanne RL, Baker I, Grogan D. Nutrient Dynamics of a Swarm-founding Social wasp Species, *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae). *Ethology*. 1987;75:291–305.
- Jeanne RL. The organization of work in *Polybia occidentalis*: costs and benefits of specialization in a social wasp. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 1986 Nov;19(5):333–41.
- Jeanne RL. The swarm founding Polistinae. In: Ross KG, Matthews RW, editores. *The social biology of wasps*. Ithaca: Cornell University; 1991. p. 7-29.
- Karsai I, Wenzel J. Organization and regulation of nest construction behavior in *Metapolybia* wasps. *Journal of Insect Behavior*. 2000;13(1):111–40.
- Keller L, Nonacs P. The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal? *Animal Behaviour*. 1993;45:787-794.
- Korb J, Heinze J. Multilevel selection and social evolution of insect societies. *Die Naturwissenschaften*. 2004 Jun;91(6):291–304.

Loope KJ, Jeanne RL. A test of adaptive hypotheses for rapid nest construction in a swarm-founding wasp. *Insectes Sociaux*. 2008 May 6;55(3):274–82.

Mateus S. Análise dos comportamentos envolvidos na organização social e no processo de enxameio de *Parachartergus fraternus* (Hymenoptera, Polistinae, Epiponini) [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras; 2005.

Mateus S, Noll FB, Zucchi R. Castes differences and related bionomic aspects of *Chartergellus communis*, a neotropical swarm-founding polistinae wasp (Hymenoptera: Vespidae: Polistinae: Epiponini). *Journal of the New York Entomological Society*. 1997;107(4): 390-405 pp.

Mateus S, Noll F, Zucchi R. Caste flexibility and variation according to the colony cycle in the swarm-founding wasp, *Parachartergus fraternus* (Gribodo) (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini). *Journal of the Kansas Entomological Society*. 2004;77(4):470–83.

Nascimento FS, Tannure-Nascimento IC, Zucchi R. Behavioral mediators of cyclical oligogyny in the Amazonian swarm-founding wasp *Asteloeca ujhelyii* (Vespidae, Polistinae, Epiponini). *Insectes Sociaux*. 2004 Feb 1;51(1):17–23.

Naumann MG. The nesting behaviour of *Protopolybia pumilia* in Panama (Hymenoptera: Vespidae) [tese]. Kansas City: University of Kansas; 1970.

Nixon KC. Winclada, Version 1.0000. Ithaca: Published by the author; 1999.

Noda S, Shima S, Noll F. Morphological and Physiological Caste Differences in *Synoeca cyanea* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini) According to the Ontogenetic Development of the Colonies. *Sociobiology*. 2003;41(1):1–24.

Noll FB. Reproductive caste in neotropical swarming wasps (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini): A comprehensive analysis. *Trends Entomol*. 2005;4:59-66.

Noll F, Mateus S, Zucchi R. Morphological Caste Differences in Neotropical Swarm-Founding Polistinae Wasps *Protopolybia exigua exigua* (Hymenoptera: Vespidae). Journal of the New York Entomological Society. 1996;104(1):62–9.

Noll F, Zucchi R. Increasing caste differences related to life cycle progression in some neotropical swarm-founding polygynic polistinae wasps (Hymenoptera Vespidae Epiponini). Ethology Ecology & Evolution. 2000 Aug;12:43–65.

Noll FB, Zucchi R. Castes and the influence of the colony cycle in swarm-founding polistine wasps (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini). Insectes Sociaux. 2002 Mar 1;49(1):62–74.

Noll F, Wenzel J, Zucchi R. Evolution of Caste in Neotropical Swarm-Founding Wasps (Hymenoptera: Vespidae; Epiponini). American Museum Novitates. 2004 Dec 25;(3467):1-24.

Noll FB, Wenzel JW. Caste in the swarming wasps: “queenless” societies in highly social insects. Biological Journal of the Linnean Society. 2008 Feb 4;93(3):509–22.

Nowak M, Tarnita CE, Wilson EO. The evolution of eusociality. Nature. Nature Publishing Group; 2010 Aug 26;466(7310):1057–62.

a) O'Donnell S. Worker biting interactions and task performance in a swarm-founding eusocial wasp (*Polybia occidentalis* Hymenoptera: Vespidae). Behavioral Ecology. 2001;12(3):353–9.

b) O' Donnell S. Worker Age, Ovary Development, and Temporal Polyethism in the Swarm-Founding Wasp *Polybia occidentalis* (Hymenoptera: Vespidae). Journal of insect behavior. 2001;14(2):201–13.

O'Donnell S. *Polybia* wasp biting interactions recruit foragers following experimental worker removals. Animal Behaviour. 2006 Mar;71(3):709–15.

O'Donnell S, Jeanne R. Methoprene accelerates age polyethism in workers of a social wasp (*Polybia occidentalis*). *Physiological entomology*. 1993;18:189-194.

a) O'Donnell S, Jeanne R. Implications of senescence patterns for the evolution of age polyethism in eusocial insects. *Behavioral Ecology*. 1995;6(3):269-273.

b) O'Donnell S, Jeanne R. Worker lipid stores decrease with outside-nest task performance in wasps: the evolution of age polyethism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1995; 51:749-752.

O'Donnell S, Hunt J, Jeanne R. Gaster-flagging during colony defense in neotropical swarm-founding wasps (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini). *Journal of the Kansas Entomological Society*. 1997;70(3):175–80.

Platt TG, Queller DC, Strassmann JE. Aggression and worker control of caste fate in a multiple-queen wasp, *Parachartergus colobopterus*. *Animal Behaviour*. 2004 Jan;67(1):1–10.

Queller DC, Strassmann JE, Solis CR, Hughes CR, DeLoach DM. A selfish strategy of social insect workers that promotes social cohesion. *Nature*. 1993 Oct 14;365(6447): 639–641.

Ribeiro CJ, Guimaraes DL, Elisei T, Prezoto F. Foraging activity rhythm of the neotropical swarm-founding wasp *Protopolybia exigua* (Hymenoptera, Vespidae, Epiponini) in different seasons of the year. *Sociobiology*. 2006;47(1): 115-123.

Richards OW. The biology of the social wasps (Hymenoptera, Vespidae). *Biol. Rev.* 1971;46: 483-528.

Richards OW. *The Social Wasps of the Americas, Excluding the Vespinae*. London: British Museum (Natural History); 1978. 580p.

Sendova-Franks A, Franks N. Self-Assembly, Self-Organization and Division of Labour.

Phil.TransR..Soc.Lond. 1999 Aug 29;354(1388):1395–405.

Schuh RT. Biological systematics: Principles and applications. Ithaca: Cornell Univ. Press; 2000.

Scotland RW, Pennington T. Homology and Systematics: Coding Characters for Phylogenetic Analysis (Systematics Association Special Volume, 58). London: Taylor and Francis; 200. p. 232.

Simões D. Etologia e diferenciação de casta em algumas vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae) [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras; 1977.

Simões D, Noll FB, Zucchi R. Duration of *Protopolybia exigua* nest and related aspects as influence by phorid fly infestation (Vespidae, Polistinae, Epiponini). Sociobiology. 1996; 28: 212-129.

Spradbery JP. Evolution of queen number and queen control. In: Ross KG, Matthews RW, editores. The social biology of wasps. Ithaca: Cornell University; 1991. p. 7-29.

Strassmann JE, Meyer DC. Gerontocracy in the social wasp, *Polistes exclamans*. Animal Behaviour. 1983;31: 431-438.

Strassmann JE, Queller D, Solis C, Hughes C. Relatedness and queen number in the Neotropical wasp, *Parachartergus colobopterus*. Animal Behaviour. 1991;42:461–70.

Strassmann JE, Gastreich K., Queller DC, Hughes C. Demographic and genetic evidence for Cyclical changes in Queen Number in a Neotropical Wasp, *Polybia emaciata*. The American Naturalist. 1992;140(3):363–72.

Strassmann JE, Sullender BW, Queller DC. Caste totipotency and conflict in a large-colony social insect. Proceedings. Biological sciences / The Royal Society. 2002 Feb 7;269(1488):263–70.

Wenzel JW. Evolution of nest architecture. In: Ross KG, Matthews RW, editores. The social biology of wasps. Ithaca: Cornell University; 1991. p. 7-29.

Wenzel JW. Behavioural Homology and Phylogeny. Annu. Rev. Ecol. Syst. 1992; 23: 361-81.

Wenzel JW. A generic key to the nests of Hornets, Yellowjackets, and Paper Wasps Worldwide (Vespidae: Vespinae, Polistinae). American Museum Novitates. 1998;(3224).

Wenzel JW, Carpenter JM. In: Eggleton P, Vane-Wright R, editores. Comparing methods: adaptive traits and tests of adaptation. Phylogenetics and Ecology. London: Academic Press; 1994. p. 79-101.

West-Eberhard MJ. Monogyny in “polygynous” social wasps. Proceedings of the VII Congress of the International Union for Study of Social Insects. London; 1973. p. 396–403.

West-Eberhard MJ. The establishment of dominance in social wasps. Proceedings of the International Union for Study of Social Insects. Wageningen; 1977. p. 223–227.

West-Eberhard MJ. Temporary queens in *Metapolybia* wasps: non-reproductive helpers without altruism? Science. 1978 Apr 200 (4340): 441–443.

West-Eberhard MJ. The Nature and Evolution of swarming in Tropical Social Wasps (Vespidae, Polistinae, Polybiini). In: Jaisson P, editor. Social Insects in the Tropics. Paris: Université Paris XIII Press; 1982. p. 97-128.

West-Eberhard MJ. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. Annual Review of Ecology and Systematics. 1989 Nov;20(1):249–78.

West-Eberhard MJ. Developmental Plasticity and Evolution. New York: Oxford University Press; 2003.

West-Eberhard MJ, Carpenter JM, Gelin L, Noll FB. *Chartergellus golfitensis* West-

Eberhard: a new species of Neotropical swarm-founding wasp (Hymenoptera: Vespidae, Polistinae) with notes on the taxonomy of *Chartergellus zonatus* Spinola. Journal of Hymenoptera Research. 2010;19(1):84–93.

Wheeler DE. The developmental basis of worker castes polymorphism in ants. American Naturalist. 1991;138: 1218–1238.

Wilson EO. The Insects Societies. Boston: Harvard University Press; 1971.