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

M. Prato

Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

MAURO PRATO

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

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

Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Mauro Prato

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

MAURO PRATO

Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

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

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Spencer Egea
Soares

RIBEIRÃO PRETO -SP

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO OU
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

FICHA CATALOGRÁFICA

Prato, Mauro

Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Natural occurrence of sexuals, production *in vitro* of queens and colony multiplication in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

--Ribeirão Preto, 2010.
114 p.: Il.; 30cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares

1. Abelhas sem ferrão 2. *Tetragonisca angustula* 3. Produção *in vitro* de rainhas 4. Multiplicação de colônias 5. Alimento larval 6. determinação de castas 7. Ocorrência natural de sexuais

Lista de figuras

Figura 1: Frequência de produção de machos, rainhas e operárias em três colônias de <i>Tetragonisca angustula</i> no período de um ano.....	34
Figura 2: Comparação entre as frequências de produção de machos, rainhas e operárias em três colônias de <i>Tetragonisca angustula</i> no período de um ano.....	35
Figura 3: Frequência de produção de machos, rainhas e operárias na população (três colônias conjuntamente) de <i>Tetragonisca angustula</i> no período de um ano.....	38
Figura 4: Taxa de produção em números totais de machos, rainhas e operárias na população (três colônias conjuntamente) de <i>Tetragonisca angustula</i> no período de um ano.....	39
Figura 5: Frequência relativa de operárias, machos e rainhas por mês de amostragem em cada uma das três colônias de <i>Tetragonisca angustula</i>	40
Figura 6: Ocorrência de machos por mês de amostragem em três colônias de <i>Tetragonisca angustula</i> , considerando a época em que os machos se tornaram reprodutivamente aptos (um mês além do período de coleta).....	44
Figura 7: Volume de alimento larval (μ l) de <i>Tetragonisca angustula</i> depositado nas células de cria de operárias/machos nos seis meses de coleta (entre 2008 e 2009). n = 4 colônias por mês de coleta (20 células de cria por colônia).....	53
Figura 8: Comparação entre as médias dos volumes totais (capacidades totais) e volumes dos alimentos contidos em células de cria de operárias/machos e células reais de <i>Tetragonisca angustula</i>	57
Figura 9: Comparação entre a proporção “volume de alimento/volume não preenchido” do interior das células de cria de <i>Tetragonisca angustula</i>	57
Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (7,5%) corado com Nitrato de Prata, contendo amostras das bandas protéicas de alimento larval.....	58
Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (7,5%) corado com Azul de Comassie, contendo amostras das bandas protéicas de alimento larval.....	59
Figura 12: Favo de cria em colônia de <i>Tetragonisca angustula</i> contendo células de cria em construção, células recém-operculadas contendo ovos, e uma célula real situada na periferia.....	64
Figura 13: Mecanismos naturais de produção de rainhas em ninhos de abelhas sem ferrão.....	68
Figura 14: Aparelhagem completa para coleta de alimento larval por sucção.....	71

Figura 15: Placa de acrílico contendo 100 pocinhos utilizada para a criação <i>in vitro</i> de rainhas.....	72
Figura 16: Condições de manutenção da placa de acrílico com larvas transferidas na estufa.....	74
Figura 17: Tempo médio de desenvolvimento pós-embrionário de rainhas (n=3) e operárias (n=15) naturais e dos indivíduos criados <i>in vitro</i> (n=27) em <i>Tetragonisca angustula</i>	78
Figura 18: Peso médio de rainhas (n=3) e operárias (n=15) naturais recém-emergidas e indivíduos criados <i>in vitro</i> (n=27) recém-emergidos de <i>Tetragonisca angustula</i>	79
Figura 19: Análise dos componentes principais entre a largura máxima da cabeça (mm) e a distância entre as tégulas (mm) realizadas nos sete grupos formados por fêmeas de <i>Tetragonisca angustula</i> criadas <i>in vitro</i> com quantidades variadas de alimento: 55 µL, 45 µL, 35 µL, 25 µL e 5 µL e obtidas naturalmente nas colônias: rainhas naturais e operárias naturais.....	80
Figura 20: Comparação entre os pesos de rainhas naturais (n=3) e rainhas produzidas <i>in vitro</i> recém-emergidas, nos experimentos 2, 3 e 4 (n=127).....	83
Figura 21: Comparação das medidas morfométricas entre rainhas naturais e criadas <i>in vitro</i> em <i>Tetragonisca angustula</i>	83
Figura 22: Mini-colônia montada em caixa racional de madeira (16 x 14 x 16 cm com tampa de vidro).....	91
Figura 23: Fatores responsáveis pela alta mortalidade das rainhas de <i>Tetragonisca angustula</i> produzidas <i>in vitro</i>	95
Figura 24: Tubo <i>Eppendorf</i> perfurado utilizado com gaiola de proteção dentro do qual as rainhas virgens (n=10) foram mantidas dentro das mini-colônias por 48 horas.....	95
Figura 25: Médias dos pesos de 16 rainhas de <i>Tetragonisca angustula</i> produzidas <i>in vitro</i> acompanhadas desde a emergência, passando pela fecundação, estabelecimento da fisiogastria, até seis meses após sua introdução em mini-colônias.....	96
Figura 26: Comparação entre os pesos das rainhas fisiogástricas de colônias naturais e rainhas fisiogástricas produzidas <i>in vitro</i> de <i>Tetragonisca angustula</i> . O peso de referência para as rainhas produzidas <i>in vitro</i> foi aquele medido após seis meses de introdução em mini-colônias órfãs.....	97

Lista de tabelas

Tabela I: Resultados sumarizados da frequência e números totais de produção de machos, rainhas e operárias em três colônias de <i>Tetragonisca angustula</i> no período de um ano.....	34
Tabela II: Frequência de produção de machos, rainhas e operárias em três colônias naturais de <i>Tetragonisca angustula</i> durante 12 meses.....	36
Tabela III: Volume (μ l) de alimento larval de <i>Tetragonisca angustula</i> depositado nas células de cria de operárias/machos nos meses de coleta.....	54
Tabela IV: Comparação entre os meses de coleta em relação ao volume de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos (n = 20) de <i>Tetragonisca angustula</i>	54
Tabela V: Média e respectivo desvio padrão (DV) do volume (μ l) de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos em 4 colônias de <i>Tetragonisca angustula</i> durante os meses de coleta.....	55
Tabela VI: Volume (μ l) de alimento, volume total (μ l) e dimensões (mm) das células reais encontradas em 4 colônias de <i>Tetragonisca angustula</i> durante os meses de coleta (2008-2009).....	56
Tabela VII: Quantificação dos aminoácidos totais e livres dos alimentos larvais de células reais (rainha) e células de operárias/machos (operária) de uma colônia de <i>Tetragonisca angustula</i>	60
Tabela VIII: Taxa de emergência de rainhas e operárias em função da variação da quantidade de alimento oferecida às larvas de <i>Tetragonisca angustula</i> em criação <i>in vitro</i>	77
Tabela IX: Distância de Mahalanobis das combinações existentes entre todos os grupos considerados na análise discriminante: fêmeas de <i>Tetragonisca angustula</i> criadas <i>in vitro</i> com quantidades variadas de alimento: 55 μ L, 45 μ L, 35 μ L, 25 μ L e 5 μ L e obtidas naturalmente nas colônias: rainhas naturais e operárias naturais, tendo como base as medidas da largura máxima da cabeça (mm) e distância entre as tégulas (mm).....	81
Tabela X: Frequência em números absolutos de eventos em cada uma das fases dos três experimentos de produção <i>in vitro</i> de rainhas e multiplicação de colônias de <i>Tetragonisca angustula</i>	94
Tabela XI: Rainhas de <i>Tetragonisca angustula</i> produzidas <i>in vitro</i> , introduzidas, fecundadas e aceitas nas mini-colônias e taxa de mortalidade das rainhas.....	94

PRATO, M. **Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2010. 114 pp. Dissertação de Mestrado (Entomologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Com o avanço da meliponicultura, a utilização das abelhas sem ferrão, assim como de seus subprodutos, tem abrangido novas áreas, como a polinização de culturas agrícolas. Assim, a demanda pelo aumento do número de colônias tem sido constante, porém devido ao pouco conhecimento sobre a biologia reprodutiva dessas abelhas, há dificuldade de produção de colônias em larga escala, acarretando uma séria limitação quanto à utilização comercial desses polinizadores. Buscamos com este trabalho, oferecer ferramentas que possibilitem a multiplicação de colônias de abelhas sem ferrão em grande quantidade em um curto período de tempo. Nas abelhas indígenas sem ferrão (exceto no gênero *Melipona* e nos casos onde ocorrem rainhas-miniatura) a quantidade de alimento ingerido pelas larvas fêmeas é o fator responsável pela diferenciação das castas, pois as larvas que se tornam rainhas ingerem mais alimento que as larvas de futuras operárias, não havendo diferença qualitativa entre o alimento fornecido às larvas que originarão ambas as castas. De acordo com este modelo de determinação de castas, buscamos estabelecer a produção *in vitro* de rainhas em *Tetragonisca angustula* oferecendo maior quantidade de alimento às larvas de operárias, induzindo seu desenvolvimento em rainhas, que após a emergência foram introduzidas em mini-colônias órfãs para verificação da sua viabilidade (fecundação natural e postura de ovos). Em condições naturais as larvas de *T. angustula* que se tornam rainhas e operárias recebem respectivamente 55 μ L e 8 μ L de alimento em média. Assim, para a produção *in vitro* de rainhas oferecemos 55 μ L de alimento a larvas de operárias coletadas em estágio pré-alimentação de ninhos naturais e conseguimos uma taxa de sobrevivência de até 51% e de 19% na obtenção de rainhas fisiogástricas, configurando um avanço em relação à taxa natural de emergência de rainhas, que foi de 0,21%. Das mini-colônias onde foram introduzidas rainhas virgens, 41% tiveram sucesso e se tornaram colônias perenes. A utilização de larvas de operárias na produção *in vitro* de rainhas é possível devido ao fato de as larvas serem totipotentes, assim como a utilização de alimento coletado de células de cria de operárias/machos, pois os resultados das análises comparativas do conteúdo

protéico e de aminoácidos totais e livres dos alimentos contidos em células de cria de operárias/machos e células reais mostraram não haver diferenças significativas. A utilização de alimento larval de *Scaptotrigona* aff. *depilis* na criação *in vitro* de rainhas de *T. angustula* mostrou a possibilidade de produção de rainhas viáveis com esta nova técnica embora os perfis protéicos dos alimentos larvais de ambas as espécies sejam diferentes. Os experimentos de produção *in vitro* de rainhas com diferentes quantidades de alimento oferecido às larvas mostraram a existência de uma quantidade limite de alimento entre 35 μ L e 45 μ L acima da qual todos os indivíduos se tornam rainhas e abaixo da qual todos se tornam operárias, não havendo a ocorrência de indivíduos intermediários (intercastas). Introduzindo as rainhas produzidas *in vitro* em mini-colônias órfãs, conseguimos o estabelecimento de 16 colônias perenes a partir de seis colônias doadoras de material no período de seis meses, o que configura um avanço de 33% em relação às técnicas tradicionais de multiplicação de colônias que conseguiriam formar, no máximo, 12 colônias no mesmo período. A verificação da frequência de produção de sexuais nas colônias naturais ao longo do ano mostrou que os machos são produzidos sazonalmente com alta taxa no período de fevereiro a abril, e embora as rainhas possuam uma produção baixa e homogênea ao longo do ano, concluímos que aquelas produzidas no período onde ocorre maior disponibilidade de machos possuem maiores chances de serem fecundadas. Assim, foi extremamente importante sincronizar a produção *in vitro* de rainhas com o período de maior disponibilidade de machos, uma vez que a fecundação destas ocorreu naturalmente. A produção *in vitro* de rainhas e a multiplicação de colônias nas abelhas sem ferrão se tornam ferramentas importantes para as técnicas de manejo que visam obter colônias em larga escala, com emprego na polinização, meliponicultura e conservação.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão; *Tetragonisca angustula*; produção *in vitro* de rainhas; multiplicação de colônias; alimento larval; determinação de castas, ocorrência natural de sexuais.

PRATO, M. **Natural occurrence of sexuals, production *in vitro* of queens and colony multiplication in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2010. 114 pp. Dissertação de Mestrado (Entomologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

With the improvement of meliponiculture, the use of stingless bees, as well as their byproducts, has comprised new areas, such as the pollination of crops. Thus, the requirement by increasing the number of colonies has been constant, but due to poor knowledge about reproductive biology of these bees, have been difficult produce colonies on a large scale, what causes serious limitations on the commercial use of these pollinators. Our goals were to offer tools that allowed the multiplication of stingless bees colonies in large quantities in a short time. In stingless bees (except in the genus *Melipona* and in cases where there are miniature-queens) the amount of food ingested by female larvae is the responsible feature for caste differentiation, because the larvae that will become queens must to ingest more food than the larvae of future workers, and there is no qualitative difference between the food provided to larvae of both castes. According to this model of caste determination, we aimed at to establish the *in vitro* production of queens in *Tetragonisca angustula*, offering a large quantity of larval food to the workers larvae, thus inducing their development into queens that after rearing were introduced in orphaned mini-colonies to verify their feasibility (natural mating and egg laying). Under natural conditions the larvae of *T. angustula* that become queens and workers receive respectively, 55 μ L and 8 μ L of food on average. Thus, for the *in vitro* production of queens we offered 55 μ L of food to workers larvae collected in pre-feeding stage from natural nests and we were able to get a survival rate up to 51 % and 19% in obtaining viable queens, which is an improvement compared to 0,21% of rearing queens observed in natural hives. About 41% of mini-colonies, where viable queens were introduced were successful and have become perennial colonies. The use of workers larvae on *in vitro* production of queens is possible because the larvae are totipotent, as well as the use of food collected from workers/males brood cells, because the results of comparative analysis of protein content and total and free amino acids of food stored in worker/males brood cells and royal cells showed no significant differences. The use of larval food from *Scaptotrigona* aff. *depilis* on *in vitro* rearing of *T. angustula* queens showed the possibility of producing viable queens, with this new technique, although the protein profiles of

larval food of both species were different. The experiments of *in vitro* production of queens with different amounts of food offered to the larvae showed the existence of a threshold quantity of food between 35 mL and 45 mL above which all individuals become queens and below which all individuals become workers, without the occurrence of intermediate individuals (intercaste). Inserting the queens produced *in vitro* in orphaned mini-colonies, we were able to establish 16 perennial colonies as from six colonies donors of material in six months, constituting an increase of 33% compared to traditional techniques of multiplication of colonies which would form up only 12 colonies in the same period. Verification of frequency of sexuals reared in natural colonies over the year showed that males are produced seasonally with high rate in the period from February to April, and although the queens have a low and homogeneous occurrence over the year, we concluded that the queens produced during the period where there is greater availability of males, have higher chances of being fertilized. Thus, was extremely important synchronize the *in vitro* production of queens with the period where there is greater availability of males, since fertilization of these queens occurred naturally. The *in vitro* production of queens and multiplication of colonies in stingless bees become important tools for handling techniques that aim to obtain colonies on a large scale, with employment in pollination, meliponiculture and conservation.

Key-words: stingless bees, *Tetragonisca angustula*, production *in vitro* of queens, colony multiplication; larval food; caste determination; natural occurrence of sexuals.

Sumário

Introdução geral.....	19
Objetivos gerais.....	26
Capítulo 1.....	28
Introdução.....	29
Material e métodos.....	33
Análise estatística.....	33
Resultados.....	34
Discussão.....	42
Capítulo 2.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos.....	50
Quantificação do volume de alimento larval e volume total das células de cria de <i>Tetragonisca angustula</i>	50
Análise do perfil protéico do alimento larval.....	51
Determinação dos teores de aminoácidos totais e livres do alimento larval.....	52
Análise estatística.....	52
Resultados.....	53
Discussão.....	61
Capítulo 3.....	65
Introdução.....	66
Material e métodos.....	70
Coleta e estocagem do alimento larval.....	70
Plaqueamento do alimento larval.....	71
Transferência de larvas para as placas de criação <i>in vitro</i>	72
Acondicionamento dos imaturos em desenvolvimento.....	73
Análise estatística.....	76

Resultados.....	77
Discussão.....	84
Capítulo 4.....	88
Introdução.....	89
Material e métodos.....	91
Montagem de mini-colônias órfãs de <i>Tetragonisca angustula</i>	91
Desenvolvimento de mini-colônias de <i>Tetragonisca angustula</i> utilizando as rainhas produzidas <i>in vitro</i>	92
Resultados.....	93
Discussão.....	98
Referências bibliográficas.....	102

PRATO, Mauro

Ocorrência natural de sexuais, produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

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

Aprovado em: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia e Genética de Abelhas, no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fapesp (processo nº 2008/52339-3), integrando o projeto temático “*Biodiversidade e uso sustentável dos polinizadores com ênfase em abelhas*”, coordenado pela Profa. Dra. Vera Lucia Imperatriz-Fonseca e financiado pela Fapesp (processo nº 2004/15801-0).

*Dedico este trabalho a Marta e Prínio, meus pais, que
permitiram, apoiaram, incentivaram e admiraram incontestavelmente
minha carreira.*

Agradeço,

Ao Professor Espencer por me apresentar o mundo das abelhas, pelo acolhimento em seu laboratório, pela orientação, pelo apoio incondicional, pela confiança e acima de tudo pela amizade e exemplo de pessoa e cientista.

Ao Jairo pela ajuda e conselhos quanto ao manejo das abelhas.

A todos os colegas de laboratório: Ivan Akatsu, Ivan Castro, Amanda, Paulo Emílio, Ana Rita, Geusa, Eddy, Aline, Camila, Sávio, Izabel e Raoni pelo companheirismo, alegria do convívio, ajuda mútua e troca de informações.

Ao Prof. Dr. João Maria Franco de Camargo (in memorian) que durante a supervisão do estágio PAE deu o exemplo de dedicação e responsabilidade envolvidos na docência, e que durante as longas e pacienciosas conversas em sua sala contribuíram muito para minha formação como biólogo e abelhudo.

À quadragésima turma de biologia da FFCLRP - USP pelos ótimos momentos juntos e pela construção lado a lado de uma nova maneira de enxergar tudo a nossa volta, o olhar do biólogo.

A toda minha família, pelo respeito, admiração e apoio, na consolidação do sonho de me tornar biólogo, professor e pesquisador.

A todos os abelhudos do Bloco A do Departamento de Genética da FMRP – USP pela contribuição com o conhecimento científico acerca das abelhas e pelas festas também.

À Fapesp pela confiança e apoio financeiro da minha pesquisa.

Ao Departamento de Biologia da FFCLRP – USP e Departamento de Genética da FMRP – USP pelo apoio e permissão da realização deste trabalho.

“A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência.”

Charles Darwin

Ode às abelhas sem ferrão

Mauro Prato

Do néctar, o mel

Da cera, o ninho

Um vôo, no céu

O tubo, um caminho

Nos favos, a cria

Nos potes, o sustento

Na realeira, rainha seria

É a quantidade alimento!

A flor vai se abrindo

A operária apressada

O sol vai surgindo

A corbícula lotada

O ovo frágil e flutuante

Pela rainha depositado

No alvéolo segue adiante

Pela operária operculado

Pólen vem, pólen vai

De toda cor, todo gosto

A operária entra e sai

Da forma ao abrigo

Tão diversas e tropicais

São as abelhas que vos digo

Pólen vai, pólen vem

Até mesmo em agosto

A colônia se mantém

Da biologia à criação

Tão ricas e especiais

São as abelhas sem ferrão

Introdução geral

Introdução geral

As abelhas são, entre os insetos, um dos grupos mais intensivamente estudados, cujos trabalhos publicados abarcam uma vasta gama, senão a totalidade, das subáreas das ciências biológicas. Atualmente é amplamente reconhecido que as abelhas formam um grupo monofilético (Alexander & Michener, 1995; Melo, 1999) possuindo uma estreita relação com um grande conjunto de vespas chamadas de vespas esfecóides (Silveira *et al.* 2002). As classificações dos himenópteros aculeados mais aceitas atualmente posicionam as abelhas junto com algumas famílias de vespas (vespas apóideas) na superfamília Apoidea (Brothers, 1999; Melo, 1999), sendo as vespas da família Crabronidae o grupo-irmão das abelhas (Silveira *et al.* 2002). A idéia mais aceita é que as abelhas tenham surgido a partir de uma nova situação adaptativa, o uso de pólen das angiospermas como alimento protéico para as larvas. As abelhas, em sua grande maioria, dependem das flores para se alimentarem, portanto, não se originaram antes do aparecimento das angiospermas. Evidências de que plantas eram polinizadas por abelhas estão datadas do início do Terciário, o que reforça a hipótese sobre o tempo de surgimento das abelhas há pelo menos 120 milhões de anos, no final da primeira metade do Cretáceo, no supercontinente Gondwana (Michener, 1979). Sendo esta hipótese correta, a primeira grande diversificação das abelhas teria ocorrido concomitantemente à grande radiação das plantas floríferas, que se deu aproximadamente entre 130 e 90 milhões de anos de anos atrás (Crane *et al.*, 1995; Wing & Boucher, 1998). Uma importante evidência disto é a mais antiga abelha fóssil conhecida – *Cretotrigona prisca* – cuja idade é estimada em cerca de 65 milhões de anos (Grimaldi, 1999). *Cretotrigona* é um meliponíneo típico e, como os meliponíneos são um dos grupos de abelhas mais derivados, presume-se que grande parte da diversidade morfológica e comportamental exibida pelas abelhas, hoje, já havia surgido ao final do Cretáceo (Silveira *et al.* 2002).

A classificação mais largamente utilizada para as abelhas é a de Michener (2000), onde o grupo é dividido em 7 famílias, 21 subfamílias e 53 tribos. A família Apidae que contém as abelhas corbiculadas, possui três subfamílias, dentre elas a subfamília Apinae composta por 19 tribos, como por exemplo, as tribos Euglossini (polinizadoras das orquídeas), Bombini (mamangavas), Apini (abelhas do gênero *Apis*) e Meliponini (abelhas sem ferrão ou meliponíneos). De acordo com esta classificação tradicional, embora seja inegável a monofilia do grupo, as abelhas não possuem um nome formal de categoria taxonômica, sendo chamado por alguns autores de “Apiformes” (Brothers, 1975).

Existem alternativas para a classificação das abelhas, com sistemas menos tradicionais já adotados por alguns pesquisadores. Silveira *et al.* (2002) propôs que as abelhas estivessem divididas em nove famílias, dentre elas a família Apidae composta por três subfamílias, onde a subfamília Apinae tem 17 tribos, das quais 13 possuem representantes no Brasil. A tribo Apini deixa de possuir somente as abelhas do gênero *Apis* e passa a incorporar quatro subtribos: Euglossina, Bombina, Apina e Meliponina, correspondentes às tribos do sistema de Michener. Melo e Gonçalves (2005) propõem um sistema ainda mais ousado em que todo o grupo das abelhas passa a ter um nome formal de categoria taxonômica, a família Apidae, então o que eram as famílias do sistema tradicional passam a serem subfamílias e assim sucessivamente as categorias foram rabaixadas. A antiga família Apidae passa a ser a subfamília Apinae, o resto permanece igual à classificação de Silveira *et al.* (2002).

Estima-se que existam cerca de 20.000 espécies de abelhas descritas, das quais 15% parasitam ninhos de outras abelhas e 80% possuem hábito solitário, portanto, apenas 5% das espécies de abelhas são sociais (Michener, 1974). Podemos encontrar graus diferentes de organização social dentro Apinae, no entanto, os indivíduos das tribos Apini e Meliponini (Michener, 2000) possuem o comportamento social mais elaborado entre as abelhas (Michener, 1974; 2000; Sakagami, 1982, Wille, 1983; Winston, 1991). A socialidade pressupõe a existência de uma organização entre os indivíduos pertencentes à mesma colônia, que cooperam com o cuidado da cria e dividem o trabalho no ninho (Wilson, 1971). Nos insetos sociais em geral, o desenvolvimento das castas está relacionado com um amplo fenômeno de polimorfismo (Nijhout & Wheeler, 1982) que nas abelhas envolve a população feminina (rainhas e operárias), apresentando diferenças acentuadas quanto à divisão de trabalho dentro da colônia. O desenvolvimento de operárias e rainhas diverge do ponto de vista morfológico e fisiológico, culminando em adultos que diferem também em suas características comportamentais (Weaver, 1966; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990).

Dentre as diferenças morfológicas entre rainhas e operárias podem-se observar, por exemplo: sistema reprodutor desenvolvido com ovários com maior número de ovários em rainhas (Michener, 1974) e a presença de corbícula, estrutura encontrada na tíbia das pernas posteriores de todos os Apidae (Michener, 1990), formada por uma cavidade envolvida por várias cerdas (Snodgrass, 1956), que é mais elaborada nas

operárias e está relacionada com a coleta de pólen e resina (Thorp, 1979). As abelhas da tribo Meliponini que compreendem o gênero *Melipona* e todos os demais gêneros (Michener, 2000), são conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão, abelhas indígenas ou meliponíneos, por apresentarem seu acúleo (ferrão) atrofiado (Nogueira-Neto, 1997). São insetos sociais de grande diversidade e de ampla distribuição geográfica (Sakagami, 1982; Roubik, 1989), podem ser encontradas em áreas tropicais e subtropicais do mundo, mas sua maior diversidade é observada nas regiões Neotropicais, ocorrendo principalmente no continente americano desde o México até o estado do Rio Grande do Sul, no Brasil (Kerr, 1969a; Nogueira-Neto, 1997) e na região Indo-Malaia (com cerca de 60 espécies), sendo que certos táxons são restritos às regiões tropicais e subtropicais do hemisfério sul (Camargo, 1989; Camargo & Pedro, 1992). Atualmente, mais de 600 espécies em 56 gêneros vivem em áreas tropicais e subtropicais do mundo; 400 espécies conhecidas existem na região Neotropical, e há uma estimativa de que existam mais de 100 para serem descritas (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). No Brasil, essa tribo é bastante representativa e já foram descritas aproximadamente 192 espécies pertencentes a 27 gêneros (Silveira *et al.*, 2002).

Sabe-se que as abelhas sem ferrão constituem um grupo ecologicamente importante, uma vez que, salvo algumas exceções, como *Trigona crassipes* e *Trigona hypogaea*, que possuem hábitos necrófagos (Nogueira-Neto, 1997; Velthuis, 1997), apresentam uma estreita relação de dependência com as plantas, as quais fornecem o alimento para as abelhas, principalmente pólen e néctar (fontes de proteína e energia, respectivamente) e em troca recebem os benefícios da transferência de pólen (Kevan & Baker, 1983; Proctor *et al.*, 1996) atuando, portanto na manutenção da diversidade das plantas como agentes polinizadores. Acredita-se, que no Brasil cerca de 40 a 90% das árvores nativas são polinizadas por abelhas sem ferrão, dependendo do ecossistema (Kerr, 1996). Assim, a grande necessidade de se conservar as espécies de meliponíneos brasileiros reside principalmente, na ampla ação como polinizadores da nossa flora que, por sua vez, garante a presença e desenvolvimento da fauna e de toda biodiversidade (Kerr *et al.*, 1996). Da mesma forma, a conservação da flora nativa também é necessária, uma vez que a fragmentação e degradação dos ambientes naturais podem prejudicar as comunidades de abelhas nativas (Kremen *et al.*, 2002) causando a perda ou a dissociação de recursos importantes para sua alimentação e locais de nidificação (Potts *et al.*, 2005).

A meliponicultura, que é a criação racional das abelhas sem ferrão, avançou bastante nos últimos anos (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). A utilização dos produtos derivados das abelhas pelo homem tem caminhado cada vez mais no sentido de deixar de ser uma prática predatória e extrativista para ser uma prática consciente de criação e manejo sistematizados. Ainda que o foco dos criadores no Brasil seja a produção de mel, um produto com atrativo valor econômico, novas demandas têm surgido e aumentado consideravelmente a procura por colônias, levando alguns criadores a se dedicarem também à multiplicação e venda de colônias. Outros produtos dessas abelhas ainda são pouco explorados, como o pólen, o cerume e a própolis.

Atualmente, uma das demandas mais crescentes é a criação de abelhas sem ferrão por lazer e entretenimento (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006), assim como a educação ambiental, utilizando as abelhas como instrumento de conscientização. As abelhas sem ferrão representam um ótimo material didático, principalmente quando criadas em caixas racionais e organizadas em um meliponário. Existem muitas espécies dóceis como a jataí que não representam risco, uma vez que não ferroam, e estão diretamente relacionadas com os conceitos envolvidos na educação ambiental (Freitas *et al.*, 2007; Sá & Prato, 2007; Menezes, 2010).

Em termos de demanda, uma que está em franco crescimento na atualidade e que é forte candidata a se tornar em breve o foco da meliponicultura, é a utilização das abelhas sem ferrão na polinização de culturas agrícolas. Há uma preocupação geral com relação à insuficiência na produção de alimentos em escala global o que se reflete sobre a preservação das abelhas uma vez que cerca de 30% dos alimentos consumidos pelos humanos é derivado de culturas polinizadas por abelhas (O'Toole, 1993; Kearns & Inouye, 1997). O papel efetivo na polinização já foi confirmado para 18 culturas agrícolas diferentes e a sua utilização em estufas foi bem sucedida para 11 das 13 espécies de abelhas testadas, que polinizaram eficientemente culturas economicamente importantes (Heard, 1999; Slaa *et al.*, 2006).

O valor econômico das abelhas melíferas (gênero *Apis*) como polinizador de culturas agrícolas foi estimado em torno de \$1.6 e \$5.7 bilhões por ano nos EUA (Southwick & Southwick, 1992), enquanto no Reino Unido gira em torno de £137.8 milhões por ano (Carreck & Williams, 1998). Numa escala global, o valor total anual da polinização de culturas agrícolas foi estimado em \$200 bilhões (Kearns *et al.*, 1998). Na

Europa, são comercializadas cerca de 1.000.000 colônias de *Bombus* para polinização de tomate por ano, entretanto, para viabilizar esse processo, foi necessário investir em estudos sobre a biologia e manejo daquelas abelhas, permitindo a multiplicação e a produção de ninhos em larga escala com maior eficiência (Velthuis, 2002; Velthuis & Van Doorn, 2006), o que também precisamos fazer com relação às nossas abelhas nativas, que representam um excelente potencial. Estes exemplos de utilização comercial de diferentes espécies de abelhas na polinização agrícola, em diversas partes do mundo, nos ajudam a dimensionar a importância da utilização das abelhas sem ferrão com o mesmo intuito aqui no Brasil, onde dispomos de uma grande diversidade de espécies.

A principal limitação para a utilização comercial desses polinizadores, porém, é a dificuldade de produção de colônias em larga escala, o que é prejudicado pelo pouco conhecimento sobre a biologia reprodutiva dessas abelhas, pelas baixas taxas de reprodução natural dos ninhos e restrições apresentadas pelas técnicas de manejo disponíveis (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). Nesse âmbito, buscamos com este trabalho, oferecer ferramentas que possibilitem a multiplicação de colônias de abelhas sem ferrão em grande quantidade em um curto período de tempo. Sendo necessário para isso incrementar o conhecimento sobre os aspectos básicos que cercam a produção natural de rainhas e machos, alimentação das larvas, determinação de castas, fecundação das rainhas, formação e crescimento das colônias. O trabalho começa com a investigação do que ocorre dentro das colônias, naturalmente, para depois adequarmos e até mesmo copiarmos o que as abelhas fazem, no laboratório.

A escolha da *Tetragonisca angustula*, popularmente conhecida no Brasil como jataí, para modelo experimental foi devido à grande importância econômica e ecológica que a espécie apresenta na região neotropical. Ela é uma das poucas espécies de abelhas sem ferrão que possui relativa quantidade de dados na literatura acerca de sua biologia e tem ampla distribuição geográfica na região neotropical (Camargo & Pedro, 2007). A jataí é um dos meliponíneos encontrados em maior número de países, distribuindo-se desde a Argentina até o México, ocorrendo em quase todo o território brasileiro (Nogueira-Neto, 1997; Roubik, 1983 e 1989; Camargo & Posey, 1990; Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1984; Cortopassi-Laurino & Gelli, 1991), exceto na Cordilheira dos Andes, na caatinga brasileira e algumas regiões da Amazônia (Oliveira *et al.*, 2004). Por ser uma abelha dócil e pequena, sua criação e manejo são facilitados, tornado-se extremamente atrativa para o

desempenho de atividades ligadas ao lazer, entretenimento e educação ambiental. Além disso, por possuir um mel de excelente qualidade e produzir uma grande quantidade de resina, a jataí possui excelente potencial para se tornar uma atividade rentável.

Tetragonisca angustula é uma abelha com grande amplitude de hábitat, pois utiliza como substrato para nidificação os mais variados materiais, como: tronco de árvores, blocos de concreto ou cerâmica, muros, alicerces de pedra, caixas metálicas e muitas outras cavidades que apresentem espaço para alojar o ninho todo (Aidar, 1999). Esta facilidade para ocupação de locais variados, com substratos diferentes para nidificação, proporcionou à *T. angustula* a adaptação inclusive a áreas urbanizadas, o que não ocorreu igualmente para a maioria das espécies de abelhas nativas (Aidar, 1997).

Segundo Nogueira-Neto (1997), a jataí (*Tetragonisca angustula*) é dentre os meliponíneos aquela mais indicada para sofrer processo de aclimação, não somente por ser uma abelha generalista quanto ao forrageamento, mas também por produzir um mel excelente, pois se trata de uma abelha muito limpa, cujo mel praticamente dispensa a pasteurização e que, além disso, é resistente e fácil de manter e multiplicar, podendo inclusive fornecer potes de pólen e de mel às colônias fracas de outras espécies.

De acordo com Nogueira-Neto (1997), a jataí é promissora na meliponicultura, pois é a abelha que apresenta maior potencial como agente polinizador de flores não polinizadas por *A. mellifera*, inclusive cultivares, por isso, é importante na maior parte do Brasil e da América Tropical, dar ênfase especial à sua criação. De acordo com Malagodi-Braga & Kleinert (2004) a jataí foi eficiente na polinização do morango em estufas, produzindo maior quantidade de frutos, mais pesados e com desenvolvimento perfeito.

Objetivos gerais

Objetivos gerais

Em linhas gerais, o presente trabalho teve por objetivos:

1. Averiguar qual a diferença na quantidade de alimento existente entre células de cria operárias e machos e células reais de *Tetragonisca angustula*, e se existem variações sazonais ao longo do ano.
2. Comparar os alimentos provenientes de células de cria operárias e machos e células reais de *Tetragonisca angustula* quanto ao conteúdo protéico e de aminoácidos totais e livres.
3. Verificar a possível produção de intercastas e/ou da quantidade mínima limite de alimento larval necessário para induzir a transformação de uma larva fêmea de *Tetragonisca angustula* em rainha, através da gradação da quantidade de alimento oferecido às larvas criadas *in vitro*.
4. Testar modificações e aperfeiçoar a técnica de produção *in vitro* de rainhas de abelhas sem ferrão a partir da manipulação da quantidade de alimento fornecido às larvas; utilizando *Tetragonisca angustula* como espécie-modelo;
5. Verificar a ocorrência natural de sexuais, principalmente dos machos, em colônias de *Tetragonisca angustula*, com a finalidade de sincronizar com a produção *in vitro* de rainhas;
6. Verificar a viabilidade reprodutiva das rainhas virgens produzidas *in vitro* introduzidas em mini-colônias órfãs através da fecundação natural e estabelecimento da fisiogastria.
7. Verificar a capacidade de *Tetragonisca angustula* em estabelecer mini-colônias a partir das rainhas obtidas pelo método de produção *in vitro*, implicando diretamente na multiplicação de colônias dessa espécie;

O presente trabalho tem como eixo central a viabilização da técnica de produção *in vitro* de rainhas em abelhas sem ferrão como uma ferramenta eficiente, que juntamente com a produção de mini-colônias visam estabelecer e padronizar a multiplicação de colônias em larga escala. Nossos objetivos vão de encontro ao esforço de programas que visam o conhecimento e conservação dos polinizadores, utilização na meliponicultura e em programas de polinização.

Capítulo 1

Capítulo 1

PRODUÇÃO DE SEXUADOS E OCORRÊNCIA DE
FECUNDAÇÃO NATURAL EM COLÔNIAS DE
Tetragonisca angustula

INTRODUÇÃO

As associações mais complexas de abelhas evoluíram mediante várias etapas, destacando-se o aparecimento de cooperação no cuidado com a cria, divisão reprodutiva de trabalho e sobreposição de gerações (Wilson, 1971). Nas abelhas altamente eusociais (Apini e Meliponini) as diferenças fisiológicas, comportamentais e às vezes morfológicas são marcantes (Weaver, 1966; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). O desenvolvimento das castas nos insetos sociais, em geral, está relacionado com um amplo fenômeno de polimorfismo (Nijhout & Wheeler, 1982), que em abelhas, envolve a população feminina, dividida entre rainhas e operárias.

A rainha possui função exclusivamente reprodutiva, sendo incapaz de sobreviver isoladamente por muito tempo e de fundar sozinha uma nova colônia. Ainda assim, a sua presença na colônia é fundamental, garantindo a integridade e funcionalidade da sociedade, pois copulam com os machos e passam o resto de seus dias realizando a postura de ovos, são fêmeas férteis responsáveis pela postura da maioria dos ovos e por todos aqueles que originarão fêmeas (operárias ou rainhas). As operárias são fêmeas estéreis ou semi-estéreis que executam as mais variadas funções, elas são responsáveis pela manutenção da colônia realizando diversas atividades, tais como, cuidado com a prole, coleta de alimento, construção e defesa do ninho, limpeza e aprovisionamento das células de cria, dentre outras (Michener, 1974; Laidlaw, 1992; Page & Peng, 2001), e em algumas espécies, realizam postura de ovos tróficos e reprodutivos (Koedam *et al.*, 2001). Os machos nascem de ovos não fecundados, são haplóides, e em várias espécies, a maioria dos machos é produto da postura de operárias (Beig, 1972).

De acordo com Zucchi *et al.* (1999) as operárias de colônias sociais avançadas geralmente se mantêm estéreis, como pode ser observado em algumas espécies tais como *Duckeola ghilianii* (Sakagami & Zucchi, 1968), *Tetragonula laeviceps* (Sakagami *et al.*, 1983), *Tetragonula minangkabau* (Suka & Inoue, 1993), incluindo espécies do gênero *Frieseomelitta* (Suka & Inoue, 1993; Zucchi *et al.*, 1999; Boleli *et al.*, 1999; 2000; Cruz-Landim, 2000). Segundo Koedam (1995), na maioria dos insetos eussociais a seleção natural favoreceu o surgimento de uma plasticidade comportamental, que permite às operárias serem capazes de realizar qualquer comportamento inerente às fêmeas daquela espécie, exceto a postura de ovos fecundados e, a adaptação dos ovários das

rainhas, relacionada às altas taxas de oviposição, é uma especialização que está acompanhada por uma mudança morfológica/fisiológica, limitando o desempenho de outros comportamentos. Entretanto, segundo Bourke (1988) esta especialização não transforma os outros grupos de fêmeas, como as operárias, em uma casta completamente estéril. As operárias do gênero *Apis* podem ter seus ovários desenvolvidos durante a ausência da rainha ou quando a população é muito grande (De Groot & Voogd, 1954). Nos meliponíneos a situação é mais complexa. Em algumas espécies, por exemplo, em *Leurotrigona muelleri*, assim como em *Apis mellifera* as operárias têm seus ovários diferenciados apenas na ausência da rainha (Sakagami & Zucchi, 1966; Cruz-Landim, 2000), entretanto, em algumas espécies as operárias apresentam ovários desenvolvidos (ativos) e produzem ovos mesmo na presença da rainha (Sakagami *et al.*, 1963). Estas operárias podem produzir dois tipos de ovos: 1) reprodutivos, que contribuem com a produção de machos da colônia (Beig, 1972; Imperatriz-Fonseca & Kleinert, 1998; Sommeijer *et al.*, 1999; Koedam *et al.*, 2001; Tóth *et al.*, 2002; Chinh *et al.*, 2003; Paxton *et al.*, 2003; Tóth *et al.*, 2004); 2) ovos tróficos, que são ingeridos pela rainha antes da postura de seus ovos (Silva *et al.*, 1972; Contel & Kerr, 1976; Bego, 1982; 1990; Sommeijer & van Buren, 1992; Koedam *et al.*, 2005). É sabido que as operárias constituem a base ergonômica da colônia, e seu papel na produção de sexuais é conhecido como fundamental (Oster & Wilson, 1978).

Os machos, normalmente são expulsos da colônia pelas operárias alguns dias após emergirem (Michener, 1948; Kerr *et al.*, 1996) e têm como função principal fecundar a rainha virgem durante o vôo nupcial. Entretanto, alguns autores observaram machos de espécies de meliponíneos realizando algumas tarefas dentro da colônia envolvendo atividades de construção, trofaláxis, desidratação de néctar (Imperatriz-Fonseca, 1973; Cortopassi-Laurino, 1979) e algumas atividades relacionadas à defesa do ninho. Para alguns autores, estas atividades são meramente acidentais (Nogueira-Neto, 1997). Até o momento, não há evidências de que a atividade de desidratação do néctar pelos machos contribua de qualquer forma como uma vantagem para a colônia (Cortopassi-Laurino, 2007). Assim, de acordo com Velthuis *et al.* (2005), a produção de machos é um investimento que está em conflito com o investimento no tamanho da colônia, pois ao contrário das operárias, a maioria dos machos não participa das atividades regulares da colônia.

Nas abelhas sem ferrão, os machos são produzidos em quantidades variáveis ao longo do ano todo nas colônias, dependendo da espécie, das condições individuais da colônia e fatores extrínsecos como as condições ambientais (Bego, 1982; Engels & Engels, 1984; Sommeijer, 1994; van Veen *et al.*, 1992). Geralmente são produzidos em grande número somente em certas épocas do ano, uma variação sazonal que se relaciona com a disponibilidade de alimento no interior das colônias, devido às variações nas condições ambientais, como por exemplo, a abundância dos recursos florais. Em *Scaptotrigona postica*, fatores extrínsecos como temperatura e precipitação, que influenciam diretamente na floração e conseqüentemente na disponibilidade de pólen e néctar, não influencia diretamente a produção de machos, pois esta espécie possui uma grande capacidade de armazenar alimento. Conseqüentemente, algumas colônias fortes produzem machos durante o ano todo, enquanto em outras colônias ocorre variação no período de produção de machos, de acordo com a disponibilidade de pólen e néctar (Bego, 1977; 1982; 1990). Em *Plebeia droryana* muitos fatores estão envolvidos na produção de machos, pois na maior parte do ano ocorre um aumento na produção de machos, células reais e favos de cria quando se aumenta a disponibilidade de pólen e néctar. Porém, durante os meses frios as colônias não produzem machos. Então, assim como em *S. postica*, a produção de machos está também relacionada com a produtividade geral da colônia, entretanto, a sazonalidade imposta pelas condições climáticas em *P. droryana* impõe um ciclo bem definido de produção de machos (Terada, 1980).

Nas espécies enxameadoras, rainhas e operárias devem, teoricamente, ter seus interesses alinhados com relação à produção de rainhas, resultando numa ocorrência extremamente baixa de rainhas entre os indivíduos do sexo feminino (Craig, 1980; Pamilo, 1991; Bourke & Ratnieks, 1999; Wenseleers *et al.*, 2003). Então, como esperado, as abelhas sem ferrão que produzem células reais possuem um baixo investimento na produção de rainhas, como foi constatado por van Veen e Sommeijer (2000) para *Tetragonisca angustula* e por Chinh e Sommeijer (2005) para *Trigona ventralis*. Algumas espécies como *Plebeia remota* e *Schwarziana quadripunctata* constroem células reais e suas rainhas são muito maiores do que as operárias. Além disso, estas espécies produzem rainhas-miniatura que emergem de células do mesmo tamanho de onde emergem operárias e machos (Ribeiro *et al.*, 2006), o que aumenta a taxa de produção de rainhas com relação às espécies onde as rainhas emergem apenas de células reais (Santo-Filho *et*

al., 2006). No gênero *Melipona*, como não há produção de células reais, as rainhas emergem de células do mesmo tamanho das células de operárias e machos e são ligeiramente menores do que as operárias ao emergirem (Wenseleers *et al.*, 2004). Podemos dizer que nas abelhas sem ferrão, exceto no gênero *Melipona* onde as rainhas são produzidas com uma frequência de até 25%, a produção de rainhas é um recurso limitado, pois a frequência é de apenas 1-2% (Kerr, 1946; 1948; 1950).

O objetivo desta parte do trabalho foi verificar a frequência de produção dos indivíduos na colônia, focando nos sexuais (machos e rainhas) em três colônias de *Tetragonisca angustula* no período de um ano. Uma investigação essencial para a sincronização entre a produção *in vitro* de rainhas e a (s) época (s) de maior produção de machos pelas colônias.

MATERIAL E MÉTODOS

Três colônias de *T. angustula* mantidas em caixas para criação racional no meliponário do Depto. de Genética da FMRP-USP foram utilizadas apenas para esse propósito. Os dados foram coletados durante 12 meses consecutivos, a partir de agosto/2008 até julho/2009. Foram coletados mensalmente três favos de cria (um de cada colônia), cujas células de cria continham indivíduos em estágio pupal pré-emergente. Ao mesmo tempo, contamos o número de novas células reais produzidas. Os favos de cria coletados foram colocados em placas de Petri contendo a identificação do ninho de origem e, levados ao laboratório onde suas células foram desoperculadas com o auxílio de um estilete de ponta fina. As pupas retiradas das células, depois de verificado o sexo, foram colocadas em placas de Petri identificadas com o número da colônia de origem e mantidas em estufa à 28°C para completarem seu desenvolvimento. Depois de emergirem, as abelhas foram devolvidas aos seus respectivos ninhos para que a sua ausência não interferisse na dinâmica da colônia. Foram coletados 7761 indivíduos, para a identificação do sexo com o auxílio de um estereoscópio (Leica Wild M3B), através da presença (macho) ou ausência (fêmea) do gonóstilo que caracteriza o aparelho reprodutor masculino. Desta forma, a frequência de produção dos indivíduos de cada colônia foi registrada mensalmente. Para a análise dos dados coletados, computamos o número total de indivíduos de ambos os sexos em cada colônia e estabelecemos uma frequência mensal. As rainhas virgens obtidas a partir das células reais coletadas foram introduzidas em mini-colônias órfãs e levadas ao meliponário onde realizamos observações diárias, registrando a ocorrência de fecundação natural.

Análise estatística

Para a análise de múltiplas amostras independentes utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* (ANOVA), para análise de duas amostras independentes utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*, considerando para ambos significativos os valores de probabilidade menores que 5% ($p < 0,05$), utilizamos também os coeficientes de correlação de *Spearman* e *Pearson*. O programa *BioEstat* 5.0 foi utilizado para realizar tais testes estatísticos.

RESULTADOS

Foram examinados 36 favos de cria coletados a partir de três colônias diferentes, 14 células reais foram encontradas e 7761 indivíduos foram analisados (tabela I).

Tabela I: Resultados sumarizados da frequência e números totais de produção de machos, rainhas e operárias em três colônias de *Tetragonisca angustula* no período de um ano.

Colônia	Favos	Células	Operárias		Machos		Rainhas	
	N°	N°	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
Col. 1	12	2593	2195	84,65	393	15,16	5	0,19
Col. 2	12	2618	2210	84,41	402	15,35	6	0,24
Col. 3	12	2550	2176	85,33	371	14,55	3	0,12
Total	36	7761	6581	84,80	1166	15,02	14	0,18

Analisando o investimento numérico em sexo observamos que as fêmeas perfazem 84,98% enquanto os machos somam 15,02%. Entre as castas (população de fêmeas), apenas 0,21% são rainhas e o restante (99,79%) são operárias (figura 1).

Figura 1: Frequência de produção de machos, rainhas e operárias em três colônias de *Tetragonisca angustula* no período de um ano.

Quando comparamos os resultados para as três colônias separadamente, percebemos que todas possuem um perfil muito semelhante quanto às freqüências de produção dos indivíduos (machos, rainhas e operárias) (figura 2).

Figura 2: Comparação entre as freqüências de produção de machos, rainhas e operárias em três colônias de *Tetragonisca angustula* no período de um ano.

Os dados coletados mostram que as freqüências de produção dos indivíduos (operárias, machos e rainhas) ao longo do ano se comportam de maneira diferente (tabela II).

Tabela II: Frequência de produção de machos, rainhas e operárias em três colônias naturais de *Tetragonisca angustula* durante 12 meses.

Colônia	Células	Operárias		Machos		Rainhas	
	N°	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
Agosto 2008							
Colônia 1	116	116	100	0	0	0	0
Colônia 2	103	101	98,0	2	2,0	0	0
Colônia 3	96	88	91,6	8	8,4	0	0
Total	315	305	96,8	10	3,2	0	0
Setembro 2008							
Colônia 1	118	117	99,2	0	0	1	0,8
Colônia 2	112	111	99,1	1	0,9	0	0
Colônia 3	119	102	85,7	17	14,3	0	0
Total	349	330	94,5	18	5,2	1	0,3
Outubro 2008							
Colônia 1	183	183	100	0	0	0	0
Colônia 2	114	108	94,7	6	5,3	0	0
Colônia 3	141	137	97,1	3	2,2	1	0,7
Total	438	428	97,7	9	2,1	1	0,2
Novembro 2008							
Colônia 1	198	198	100	0	0	0	0
Colônia 2	189	171	90,4	17	9,0	1	0,6
Colônia 3	126	118	93,6	8	6,4	0	0
Total	513	487	94,9	25	4,9	1	0,2
Dezembro 2008							
Colônia 1	256	252	98,4	3	1,2	1	0,4
Colônia 2	248	236	95,1	12	4,9	0	0
Colônia 3	235	219	93,2	16	6,8	0	0
Total	739	707	95,7	31	4,2	1	0,1
Janeiro 2009							
Colônia 1	282	275	97,5	7	2,5	0	0
Colônia 2	287	226	78,7	59	20,6	2	0,7

Colônia 3	278	253	91	25	9,0	0	0
Total	847	754	89	91	10,8	2	0,2

Fevereiro 2009

Colônia 1	281	213	75,8	66	23,5	2	0,7
Colônia 2	276	207	75,0	68	24,6	1	0,4
Colônia 3	289	211	73	78	27	0	0
Total	846	631	74,5	212	25,1	3	0,4

Março 2009

Colônia 1	259	157	60	102	40	0	0
Colônia 2	307	201	65,5	106	34,5	0	0
Colônia 3	295	203	68,8	91	30,8	1	0,4
Total	861	561	65,2	299	34,7	1	0,1

Abril 2009

Colônia 1	260	84	32,3	176	67,7	0	0
Colônia 2	265	149	56,2	115	43,4	1	0,4
Colônia 3	277	175	63,2	102	36,8	0	0
Total	802	408	50,8	393	49,1	1	0,1

Maio 2009

Colônia 1	227	190	83,6	36	15,9	1	0,5
Colônia 2	252	235	93,2	16	6,4	1	0,4
Colônia 3	247	228	92,3	18	7,3	1	0,4
Total	726	653	90	70	9,6	3	0,4

Junho 2009

Colônia 1	217	214	98,6	3	1,4	0	0
Colônia 2	251	251	100	0	0	0	0
Colônia 3	260	257	98,8	3	1,2	0	0
Total	728	722	99,1	6	0,9	0	0

Julho 2009

Colônia 1	196	196	100	0	0	0	0
Colônia 2	214	214	100	0	0	0	0
Colônia 3	187	185	99,0	2	1,0	0	0
Total	597	595	99,7	2	0,3	0	0

Quando analisamos a população (três colônias estudadas) percebemos que proporcionalmente, a frequência de produção das operárias é constante ao longo do ano, mantendo uma taxa muito próxima de 100%, entretanto em janeiro inicia-se uma queda que culmina em abril com uma taxa de 50% (figura 3). Porém, analisando a taxa de produção de operárias com base apenas no número de indivíduos, há a ocorrência de dois períodos de alta produção e dois períodos de menor produção ao longo do ano (figura 4). Nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro, março, maio, junho e julho a produção de operárias ultrapassa 500 indivíduos, enquanto nos meses de agosto, setembro, outubro, novembro e abril a produção é menor que 500 indivíduos (figura 4).

Figura 3: Frequência de produção de machos, rainhas e operárias na população (três colônias conjuntamente) de *Tetragonisca angustula* no período de um ano.

A produção de machos, considerando a população (três colônias analisadas) pode ocorrer durante o ano todo, entretanto, há uma clara variação sazonal com apenas um pico de produção durante o ano (figuras 3 e 4). A variação na produção de machos possui grande amplitude ao longo do ano, pois a porcentagem média de células com machos em estágio pupal variou de 0,3% (n=2) em julho até 49,1 % (n=393) em abril (tabela II). A produção de machos se mantém baixa na maior parte do ano como, por exemplo, nos meses de junho e julho, quando a taxa de indivíduos produzidos pertencentes ao sexo masculino se mantém próxima de zero e começa a aumentar a partir de janeiro, situação que se estende até abril, quando ocorre o pico de produção (figuras 3 e 4).

A ocorrência de rainhas nas colônias estudadas manteve uma frequência próxima de zero durante o ano todo (figuras 3 e 4), variando de 0% em agosto, junho e julho até 0,4% em fevereiro e maio (tabela II). Não observamos nenhuma época de produção diferenciada de rainhas, podendo afirmar que estas são produzidas de maneira homogênea ao longo do ano, sem nenhuma tendência à variação sazonal.

Figura 4: Taxa de produção em números totais de machos, rainhas e operárias na população (três colônias conjuntamente) de *Tetragonisca angustula* no período de um ano.

Analisando as três colônias separadamente (figura 5), percebemos que embora a colônia 1 tenha sido a mais populosa (tabela II) e com as maiores amplitudes de produção de machos e operárias, as frequências de produção dos indivíduos são semelhantes em todas as colônias não havendo diferença significativa. Notamos que as operárias são produzidas em todos os meses por todas as colônias. A ocorrência de machos na colônia 1 se deu durante sete meses (dezembro/08 a junho/09), na colônia 2 houve produção de machos durante a maior parte do ano, somente em junho/09 e julho/09 não foram observados machos, enquanto na colônia 3 estes foram produzidos em todos os meses analisados. Considerando a população podemos dizer que os machos são produzidos o ano todo, mesmo em quantidades muito baixas em certas épocas do ano. A figura 5 evidencia que nas três colônias ocorreu produção sazonal de machos, sendo o mês de abril o de maior produção.

Figura 5: Frequência relativa de operárias, machos e rainhas por mês de amostragem em cada uma das três colônias de *Tetragonisca angustula*.

A ocorrência de rainhas também foi muito semelhante em todas as colônias, os meses de maior produção foram fevereiro e maio com três rainhas cada. Em fevereiro observamos duas rainhas da colônia 1 e uma rainha da colônia 2, enquanto em maio ocorreu uma rainha em cada colônia. Maio foi o único mês em que ocorreu produção de

rainhas em todas as colônias, em contrapartida, junho e julho foram os únicos meses em que não houve produção de rainhas (tabela II).

Os dados médios da frequência de operárias, machos e rainhas produzidos ao longo do ano (12 meses) foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* considerando nível de significância inferior a $\alpha=0,05$, para os machos e operárias encontramos, respectivamente, que $p=0,0031$ e $p=0,0014$ indicando que existe diferença significativa tanto na frequência de machos quanto na frequência de operárias produzidos entre os meses aqui estudados. Para as rainhas encontramos que $p=0,7218$ indicando que não existe diferença significativa na frequência de rainhas produzidas entre os meses aqui estudados. Quando analisamos as colônias entre si encontramos que não houve diferença significativa para nenhuma das classes de indivíduos avaliados (operárias, $p= 0,9753$; machos, $p= 0,3759$ e rainhas, $p= 0,7341$), demonstrando haver uma sincronia na produção dos indivíduos entre as colônias. Utilizando o coeficiente de *Spearman* (varia de -1 a 1) para análise de correlação das amostras das classes de indivíduos par a par, percebemos que a produção de rainhas se correlaciona muito fracamente com as outras classes (Rainhas x Machos, $p= 0,0152$; Rainhas x Operárias, $p= 0,3220$), enquanto as produções de machos e operárias encontram-se fortemente correlacionadas com $p= 0,8290$.

Das 14 rainhas virgens introduzidas em mini-colônias e levadas ao meliponário, 8 (57,1%) se tornaram fisiogástricas, sendo 2 fecundadas em março, 2 em abril, 3 em maio e 1 em dezembro.

DISCUSSÃO

A produção sazonal de sexuais nos insetos sociais é um evento dependente de interações complexas entre fatores intra e extra coloniais (van Veen *et al.*, 1999). De acordo com Bego (1977, 1982, 1990) e van Veen e Sommeijer (1990), a produção natural de machos ocorre em condições específicas relacionadas à produtividade da rainha, à densidade populacional e quantidade de pólen armazenado nas colônias de meliponíneos. A ocorrência de machos ao longo de todo o ano foi relatada em *Scaptotrigona postica* (Kerr *et al.*, 1962; Bego, 1977, 1982, 1990), em *Melipona subnitida* (Contel & Kerr, 1976), *Scaptotrigona depilis* (Lacerda, 2000); *Plebeia remota* (Alves *et al.*, 2009) e *Trigona (Lepidotrigona) ventralis* (Chinh & Sommeijer, 2005). Em algumas espécies, entretanto, a produção de machos tem se mostrado sazonal como, por exemplo: *Melipona favosa* (Sommeijer *et al.*, 1999); *Trigona nigra* (Sommeijer *et al.*, 1984); *Melipona beecheii* (van Veen *et al.*, 1992), *Leurotrigona muelleri* (Terada, 1974); *Melipona quadrifasciata* (Camargo, 1976; Bezerra, 1995), *Plebeia (Friesella) schrotkyi* (Camillo-Atique, 1977) e *Schwarziana quadripunctata* (Alves & Imperatriz-Fonseca, 2005). Velthuis *et al.* (2005) reviram os padrões de produção de machos em algumas espécies de abelha sem ferrão e verificaram que os períodos cíclicos de produção de machos (MPP) ocorrem em colônias individuais, também observado em *Melipona favosa* (Chinh *et al.*, 2003) e *Melipona bicolor* (Alves, 2004), embora isto não reflita no contexto populacional, ou seja, geralmente a produção de machos ocorre continuamente ao longo do ano.

Como resultado da verificação da frequência de produção dos indivíduos em três colônias de *T. angustula*, observamos que a ocorrência de machos durante os doze meses de estudo variou sazonalmente, tanto nas colônias (individualmente) quanto na população (colônias agrupadas), apresentando apenas um período de alta produção durante o ano, que se inicia em janeiro e termina com um pico no mês de abril, ou seja, apenas quatro meses de alta produção, enquanto na maior parte do ano a produção se mantém baixa. Muito embora, quando analisamos a população percebemos que os machos podem ser produzidos o ano todo, mesmo nos períodos em que a taxa se aproxima de zero. Este resultado corrobora o trabalho de Grosso e Bego (2000) que

encontrou uma produção sazonal de machos para a mesma espécie, onde o período de maior produção foi de fevereiro a maio.

Bego (1982) aponta que os fatores extrínsecos à colônia como a temperatura e precipitação, que desempenham papel na disponibilidade de alimento no ambiente, não são os fatores determinantes na produtividade de machos; segundo a autora, os fatores intrínsecos como a densidade populacional da colônia, que pode ser consequência do estoque de pólen e mel, são os fatores determinantes. Em seu estudo com *Melipona beecheii*, Moo Valle *et al.* (2001) testando o efeito da nutrição na produção de sexuais, observaram que as colônias pouco alimentadas produziram 0,7% de machos na população, enquanto as colônias superalimentadas produziram 23,4%, concluindo que as reservas de alimento tem forte influência na produção dos machos. É válido ressaltar que as células de cria coletadas mensalmente nas colônias de *T. angustula* eram compostas por células que continham abelhas nos estágios de pupa. Observamos que as pupas de macho coletadas levaram em média 14 a 20 dias para completar seu desenvolvimento e emergir do casulo. Portanto, devemos considerar que na natureza, os indivíduos adultos que estão aptos a desempenharem seu papel reprodutivo, serão encontrados no mês seguinte ao da coleta dos dados aqui apresentados (figura 6). Os dados obtidos acerca da produção de machos em *Tetragonisca angustula*, são importantes, pois sabendo as épocas de maior disponibilidade de machos na natureza, podemos sincronizar com a produção *in vitro* das rainhas, aumentando o sucesso na fecundação natural e estabelecimento das mini-colônias.

Figura 6: Ocorrência de machos por mês de amostragem em três colônias de *Tetragonisca angustula*, considerando a época em que os machos se tornaram reprodutivamente aptos (um mês além do período de coleta). Os símbolos ♂ denotam as fecundações naturais das rainhas virgens introduzidas em mini-colônias órfãs.

Como mencionado anteriormente, a quantidade de alimento estocado nas colônias influencia diretamente na produção de machos, entretanto, este não foi um parâmetro avaliado neste estudo. Segundo Grosso e Bego (2000) a produção de machos ao longo do ano em *T. angustula* está correlacionada positivamente com o número de potes de mel, potes de pólen e o número de favos de cria encontrados no interior das colônias, reforçando a hipótese de que a quantidade de alimento disponível dentro das colônias é um fator determinante na produção de machos. Contudo, estudos mais detalhados a respeito de tal tema devem ser realizados, para que a influência do alimento estocado na produção de sexuais nesta espécie possa ser esclarecida.

No presente estudo, a maior produção de machos coincidiu com o período de maior produção de indivíduos nas colônias (figura 4), já a produção de rainhas, que é baixa (0,21%), não se correlaciona nem com a de machos e nem com a de operárias, tendo uma distribuição homogênea ao longo do ano. Em estudo realizado com *Plebeia remota* e *Schwarziana quadripunctata*, Santos-Filho *et al.* (2006) encontrou que a

produção de rainhas é extremamente baixa, sendo que estas perfazem apenas 0,08% entre os indivíduos e 0,1% entre as fêmeas, possuindo baixa correlação com as produções de machos e operárias.

Encontramos uma forte correlação negativa entre a produção de machos e operárias, o que também foi encontrado por Santos-Filho *et al.* (2006) para *P. remota* e *S. quadripunctata* e por Moo-Valle *et al.* (2001) em *Melipona beecheii*. Quando observamos os gráficos das figuras 3 e 5 percebemos que os perfis de produção de machos e operárias são gráficos em espelho, ou seja, a colônia abre mão de produzir operárias, no período onde há maior quantidade de recurso alimentar disponível e conseqüentemente maior produção de indivíduos, para investir na produção de machos. Confirmando esta tendência, ao analisarmos o gráfico da figura 4 que leva em consideração apenas os números totais de cada classe de indivíduo e o número total de indivíduos, percebemos que a correlação entre as produções de operárias e machos se comportam de duas maneiras diferentes ao longo do ano, pois nos períodos onde a produção total de indivíduos é relativamente baixa (abaixo de 700 indivíduos) que corresponde ao período de julho a novembro, há uma correlação (coeficiente de *Pearson*) fortemente positiva entre a produção de machos e operárias ($p = 0,810921$), enquanto nos períodos onde a produção total de indivíduos é relativamente alta (acima de 700 indivíduos) que corresponde ao período de dezembro a junho, há uma correlação fortemente negativa entre a produção de machos e operárias ($p = -0,91552$). Estes dados mostram que nos períodos onde há menor produção de indivíduos na colônia, machos e operárias seguem a mesma variação, ou seja, se aumenta a produção de indivíduos, aumenta também a produção de machos e operárias, enquanto nos períodos onde há maior produção de indivíduos na colônia, as produções de machos e operárias são inversamente proporcionais, ou seja, conforme aumenta a produção de machos, diminui a produção de operárias. Então, no período onde há maior quantidade de recurso alimentar e conseqüentemente maior produção de indivíduos, as colônias abrem mão de produzir operárias para produzir machos, que na região onde estavam localizadas as colônias ocorreu de fevereiro a maio.

Ao observar os resultados totais percebemos que nas colônias analisadas ocorre uma enorme assimetria no investimento numérico tanto com relação às castas quanto aos sexos, pois investem maciçamente na produção de operárias em detrimento à

produção de rainhas e os machos são produzidos em pequena quantidade se comparado com as fêmeas, porém entre os sexuais houve maior produção de machos em detrimento às rainhas. Segundo Wenseelers *et al.* (2003), a presença de células reais, as quais estão ligadas funcionalmente à determinação trofotênica de castas, permitem um alto grau de exatidão e precisão quanto ao número e a época de produção de rainhas. Isto sugere que rainhas e operárias devem, teoricamente, ter seus interesses alinhados com relação à produção dos sexuais, favorecendo uma ocorrência extremamente baixa de rainhas. Com isso, seria esperado que a taxa de produção dos sexuais tendesse para a maior produção de machos.

O ciclo de produção de machos nas três colônias foi sincronizada, provavelmente em resposta aos mesmos fatores ambientais que afetaram secundariamente as condições internas das colônias.

As rainhas virgens introduzidas em mini-colônias órfãs e levadas ao meliponário foram fecundadas em sua maioria (87,5%, $n = 7$) no período de maior disponibilidade de machos (fevereiro a maio) (figura 6). Dividindo o período de amostragem em dois, alta (fevereiro a maio) e baixa (junho a janeiro) produção de machos, notamos que estes foram significativamente diferentes segundo o teste de *Mann-Whitney* ($p = 0.0484848 < 0,05$) para a fecundação das rainhas. Embora não haja uma sincronia entre a produção de machos e rainhas, pois a produção de rainhas foi homogênea, as rainhas produzidas na época de maior disponibilidade de machos possuem mais chances de serem fecundadas.

Capítulo 2

Capítulo 2

O ALIMENTO LARVAL CONTIDO NAS CÉLULAS
DE CRIA EM COLÔNIAS DE *Tetragonisca*
angustula

INTRODUÇÃO

Nos Hymenoptera sociais, e particularmente nas abelhas, a quantidade de alimento é um importante fator na determinação de castas (Wirtz & Beetsma, 1972), pois a diferenciação entre rainhas e operárias depende primordialmente de fatores nutricionais e/ou sociais (Wilde & Beetsma, 1982; Wheeler, 1986). Em *Apis mellifera*, a determinação de castas depende da quantidade e da composição do alimento consumido pelas larvas, pois nos três primeiros dias, as larvas de rainhas, operárias e machos recebem o mesmo tipo de alimento, produzido pelas operárias nutridoras, uma mistura de secreções de suas glândulas hipofaríngeas com mel. A partir do quarto dia, as larvas de operárias e machos passam a receber pólen na sua dieta, enquanto as larvas de rainhas recebem apenas geléia real, um alimento qualitativamente mais rico que promove sua diferenciação em rainha (Weaver, 1974).

Nas abelhas sem ferrão, a alimentação dos imaturos não ocorre de forma progressiva, como em *Apis*, pois todo o alimento que será ingerido pelo imaturo ao longo de seu desenvolvimento é regurgitado na célula de cria construída pelas operárias, antes da rainha ovipor, o que é conhecido como aprovisionamento massivo (Schwarz, 1948; Nogueira-Neto, 1953; Michener 1974; Sakagami, 1982). Após o aprovisionamento e oviposição da rainha, as operárias operculam as células de cria, portanto, nestas abelhas não há contato entre a população adulta e os imaturos em desenvolvimento (Velthuis, 1997). As abelhas sem ferrão diferem das outras abelhas que apresentam alimentação massal por terem um alimento larval líquido e viscoso, sobre o qual o ovo permanece na posição vertical (Velthuis & Velthuis, 1998), sendo o alimento larval constituído por uma mistura de secreções glandulares, produzidas pelas operárias, pólen e mel com aproximadamente 16% de pólen e 8% de mel (Kerr & Laidlaw, 1956).

Hartfelder e Engels (1989), analisando sete espécies de abelhas sem ferrão, constatou que, em geral, o alimento larval é composto por 40-60% de água, 5-12% de açúcares, 1,1-19,4% de proteínas e 0,2-1,3% de aminoácidos livres. Além desses componentes solúveis em água, cerca de 30% ou mais do alimento larval é composto por pólen e lipídios. Segundo Hartfelder *et al.* (2006), a compreensão de como as colônias regulam a alimentação larval nas abelhas sem ferrão é de extrema importância para entender os processos biológicos e evolutivos envolvidos na produção de rainhas,

reprodução das colônias e determinação de castas. Castilho-Hyodo (2001) observou que em *Schwarziana quadripunctata*, a quantidade de alimento depositado nas células de cria varia ao longo do ano, sendo maior em estações do ano com maior disponibilidade de recursos alimentares, o que também foi observado por Menezes (2010) em *Scaptotrigona* aff. *depilis*, por Baptistella (2009) em *Frieseomelitta varia*, por Ribeiro e Manoel (2002) em *Plebeia remota* e por Ramalho *et al.* (1998) em *Melipona quadrifasciata*.

Os objetivos desta etapa do trabalho foram: verificar se há diferenças na quantidade de alimento larval depositado nas células de cria de operárias/machos de *T. angustula* em diferentes épocas do ano, determinar a média da quantidade de alimento contido nas células de cria de operárias/machos e células reais, determinar o volume total e as dimensões das células de cria, principalmente das células reais, para que essas possam ser reproduzidas artificialmente, e realizar comparação do perfil protéico e de aminoácidos dos alimentos larvais contidos em células de cria de operárias/machos e células reais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quantificação do volume de alimento larval e volume total das células de cria de *Tetragonisca angustula*

Para este estudo foram utilizadas quatro colônias de *T. angustula* mantidas em caixas de madeira para criação racional sobre suportes individuais no meliponário do Departamento de Genética da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto -USP. A cada dois meses era coletado um favo de cria com células recém-operculadas, na fase embrionária (contendo ovos) de cada colônia. As coletas foram realizadas de março/2008 a janeiro/2009 nos meses de março, maio, julho, setembro e novembro de 2008 e janeiro de 2009. De cada favo eram escolhidas ao acaso 20 células de cria para serem analisadas. Durante este período foram coletados 24 favos e foram analisadas 480 células de cria de operárias/machos e sete células reais. Os favos de cria e as células reais encontradas eram levados ao laboratório onde foram desoperculados (célula por célula) com um estilete de ponta fina. Os ovos foram removidos para que seu conteúdo protéico não interferisse no experimento. Posteriormente o conteúdo alimentar de cada célula foi quantificado volumetricamente utilizando-se microcapilares de 20 μL graduados de 5 μL em 5 μL (para células de cria de operárias/machos) e de 50 μL graduados de 10 μL em 10 μL (para células reais), conectados a um micropipetador manual. Após a retirada do alimento de todas as células, incluindo as células reais, estas eram preenchidas totalmente com água para que seu volume total fosse medido, utilizando o mesmo procedimento já descrito acima para medição da quantidade de alimento. Todo o alimento retirado das células foi estocado em frascos *Eppendorf* devidamente identificados e acondicionados em freezer a -21°C para utilização nas etapas posteriores. Após a coleta os favos de cria eram devolvidos às colônias de origem.

Para a realização das medidas da altura e do maior diâmetro das células reais foi utilizado um paquímetro. A importância de se conhecer as dimensões das células reais consiste no fato de que para a criação *in vitro*, as larvas de operárias deverão ser transferidas de suas células de cria naturais para células de cria artificiais que possuam dimensões similares às das realeiras e contendo a mesma quantidade de alimento.

Análise do perfil protéico do alimento larval

Para análise do conteúdo protéico foram utilizadas amostras de alimento coletados de células de cria de operárias/machos de *T. angustula* e de *Scaptotrigona* aff. *depilis* e amostras coletadas das células reais de *T. angustula* encontradas. Como padrão foi utilizado extrato total de duas operárias de *T. angustula* maceradas. O conteúdo foi centrifugado a 4°C e 15.000 RPM por 10 minutos em centrífuga RC5C. Posteriormente, foi coletado 1µL do sobrenadante e misturado com 9µL de solução salina 0,9%. As amostras de alimento também foram centrifugadas a 4°C e 15.000 RPM por 10 minutos em centrífuga RC5C e posteriormente, 1µL do sobrenadante foi diluído em 4µL água destilada, depois 1µL desta solução foi diluído em 9µL de solução tampão da amostra. Os marcadores de alto e baixo peso molecular foram aplicados na quantidade de 5µL cada.

As eletroforeses em condições desnaturantes (SDS) foram realizadas segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). No sistema eletroforético foi utilizado gel de concentração igual ou superior a 7,5% contendo bis-acrilamida:acrilamida (0,8:30, m/v) em Tris-HCl a 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 0,1% e gel de separação igual ou inferior a 12% contendo bis-acrilamida:acrilamida (0,8:30, m/v) em Tris-HCl 2,0 M, pH 8,8 e SDS 0,1%. Os géis foram polimerizados em placas de vidro (10,5 x 10 mm), as quais foram acopladas em reservatório contendo tampão Tris-glicina 0,1 M, pH 8,3. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl a 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol a 10%, β-mercaptoetanol 5% (v/v), SDS a 2% e azul de bromofenol a 0,001%. As soluções foram aquecidas a 100°C por 5 min e aplicadas nos poços, num volume final de 15 µL. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina (0,1 M) e SDS a 0,1% pH 8,3, utilizando uma fonte de energia programada com uma corrente de 30 mA constantes do início ao fim da corrida em cuba vertical. Foram montados quatro géis em épocas diferentes, dois foram corados com Nitrato de Prata e outros dois com uma solução de Azul de Comassie R-250 em água e metanol, na proporção de 1:1 (v/v). A mobilidade eletroforética relativa de cada banda foi determinada em centímetros e a massa molecular foi calculada, relacionando-se a mobilidade eletroforética relativa com o logaritmo do peso molecular do padrão.

Determinação dos teores de aminoácidos totais e livres do alimento larval

Para análise dos aminoácidos totais e livres, utilizamos amostras de alimento larval coletado em células de cria de operárias/machos e células reais de *T. angustula*. A determinação dos teores de aminoácidos foi realizada no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As amostras passaram por hidrolisação prévia com ácido clorídrico (HCl) bidestilado 6N, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivativos feniltiocarbamilaminoácidos (PTC-aa), em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag – 3,9x300 mm), com detecção por UV a 254 nm. A quantificação da amostra foi baseada na altura de cada pico de aminoácido, tendo-se usado como referência a altura do pico do padrão interno de aminoácidos com concentração conhecida, com o padrão derivado nas mesmas condições e no mesmo tempo das amostras. Os teores de aminoácidos foram quantificados em µg de aminoácido para 1 µL de alimento.

Análise estatística

Para testar se a quantidade de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos em *T. angustula* foi influenciada pelas diferentes épocas do ano foi realizado o teste *One-Way* ANOVA. O mesmo foi feito para avaliar se a quantidade de alimento nas células de cria foi diferente em cada colônia amostrada. Para comparar as épocas do ano entre si utilizamos o teste de *Friedman* para comparações múltiplas par a par. Para comparar o volume de alimento e volume total (capacidade total) das células reais com o alimento das células de operárias/machos, foram realizados testes-t. Para comparação entre volume de alimento e volume total das células de cria de operárias/machos e células reais utilizamos o teste de *Mann-Whitney* para duas amostras independentes. Para comparação das quantidades de aminoácidos livres e totais presentes nos alimentos provenientes de células reais e células de operárias/machos utilizamos o teste ANOVA e o coeficiente de correlação de *Spearman*, para duas amostras pareadas e relacionadas. O programa *BioEstat* 5.0 foi utilizado para realizar tais testes estatísticos.

RESULTADOS

As variações sazonais apresentaram efeito significativo sobre a quantidade de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos em *Tetragonisca angustula* (figura 7), em relação ao volume (ANOVA, $p < 0,0001$).

Figura 7: Volume de alimento larval (µl) de *Tetragonisca angustula* depositado nas células de cria de operárias/machos nos seis meses de coleta (entre 2008 e 2009). n = 4 colônias por mês de coleta (20 células de cria por colônia).

Os meses de coleta foram comparados entre si para identificar as diferenças mais acentuadas em relação ao volume do alimento, além de verificar quais meses foram diferentes estatisticamente entre si (tabela III). Março foi o mês com maior quantidade de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos, e o único mês que diferiu estatisticamente de todos os outros meses analisados (tabela IV). Nos demais meses, a quantidade de alimento nas células de cria de operárias/machos foi semelhante, apesar de algumas diferenças terem sido significativas. Julho foi o mês com menor quantidade de alimento e só não diferiu estatisticamente do mês de setembro que também possui um valor baixo (tabela IV).

Tabela III: Volume (μL) de alimento larval de *Tetragonisca angustula* depositado nas células de cria de operárias/machos nos meses de coleta. $n = 80$ células por mês, DP = Desvio padrão.

Meses de coleta	Volume (μL)			
	Média	DP	Max.	Min.
Mar/08	9,3	1,1	11,0	6,5
Mai/08	8,0	0,9	10,5	6,5
Jul/08	6,9	0,6	9,0	5,5
Set/08	7,3	0,7	10,0	6,0
Nov/08	7,7	0,7	10,0	7,0
Jan/09	7,9	0,9	10,5	6,0
Total	7,85	0,8		

Tabela IV: Comparação entre os meses de coleta em relação ao volume de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos ($n = 20$) de *Tetragonisca angustula*.

Teste de Friedman comparações múltiplas par a par	Diferença	Valores de (p)
Março/08 x Maio/08	116,5	< 0,05
Março/08 x Jul/08	263,5	< 0,05
Março/08 x Set/08	216	< 0,05
Março/08 x Nov/08	151	< 0,05
Março/08 x Jan/09	141	< 0,05
Maio/08 x Jul/08	147	< 0,05
Maio/08 x Set/08	99,5	< 0,05
Maio/08 x Nov/08	34,5	não significativo
Maio/08 x Jan/09	24,5	não significativo
Jul/08 x Set/08	47,5	não significativo
Jul/08 x Nov/08	112,5	< 0,05
Jul/08 x Jan/09	122,5	< 0,05
Set/08 x Nov/08	65	não significativo
Set/08 x Jan/09	75	< 0,05
Nov/08 x Jan/09	10	não significativo

Tabela V: Média e respectivo desvio padrão (DV) do volume(μl) de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos em 4 colônias de *Tetragonisca angustula* durante os meses de coleta. n = 120 células por colônia.

Meses de coleta	Colônia	Volume (μL)	
		Média	DP
Mar/08	1	8,45	1,0
	2	9,95	0,75
	3	9,25	0,96
	4	9,65	1,0
Mai/08	1	8,45	1,0
	2	7,97	0,83
	3	8,22	0,89
	4	7,45	0,45
Jul/08	1	7,05	0,27
	2	6,7	0,57
	3	7,3	0,8
	4	6,87	0,62
Set/08	1	7,3	0,8
	2	7,4	0,75
	3	7,22	0,38
	4	7,35	0,87
Nov/08	1	7,9	0,85
	2	7,22	0,38
	3	8,25	0,86
	4	7,72	0,55
Jan/09	1	7,4	0,68
	2	7,87	0,88
	3	7,95	0,94
	4	8,45	1,0

Analisando as colônias individualmente, foi possível detectar que não existe influência do estado de cada colônia sobre a quantidade de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos (ANOVA; Volume: $F = 1,2421$; $p = 0,2931$, portanto, $p > 0,05$) (tabela V).

As células reais foram encontradas em cinco meses diferentes entre os anos de 2008 e 2009. Segundo teste-t com valores significativos menores que $p = 0,05$, para o volume de alimento não houve diferença significativa ($p = 0,0879$), porém quanto ao volume total (capacidade total) houve diferenças significativas entre as células reais encontradas ($p = 0,0494$) (tabela VI).

Tabela VI: Volume (μl) de alimento, volume total (μl) e dimensões (mm) das células reais encontradas em 4 colônias de *Tetragonisca angustula* durante os meses de coleta (2008-2009). $n = 7$ células reais. DP: desvio padrão.

N°	Colônia	Data	Volume alimento (μl)	Volume total (μl)	Altura (mm)	Diâmetro (mm)
1	1	Mai/08	50	80	10	5
2	1	Jun/08	50	74	10	5
3	2	Ago/08	54	82	10	6
4	3	Ago/08	50	83	9	5
5	4	Out/08	55	80	10	5
6	4	Out/08	52	78	10	5
7	1	Abr/09	50	73	9	5
Média + DP			$51,5 \pm 2,2$	$78,5 \pm 3,8$	$9,7 \pm 0,48$	$5,2 \pm 0,38$

Quando comparamos as células de cria de operárias/machos e células reais, através do teste de *Mann-Whitney* para duas amostras independentes, notamos que tanto para o volume de alimento ($p = 0,0001$, portanto $p < 0,05$) quanto para o volume total (capacidade total) ($p = 0,0001$, portanto, $p < 0,05$), há diferenças significativas. As larvas que se tornam rainhas ingerem em média, aproximadamente $43,6 \mu\text{L}$ (6,6 vezes mais) a mais de alimento do que as larvas que se tornam operárias e/ou machos; as células reais possuem uma capacidade total (volume interno), em média, 5,5 vezes maior que as células de operárias/machos (figura 8).

Figura 8: Comparação entre as médias dos volumes totais (capacidades totais) e volumes dos alimentos contidos em células de cria de operárias/machos e células reais de *Tetragonisca angustula*.

Se compararmos a quantidade média de alimento encontrada em cada uma (51,5 μL para células reais e 7,85 μL para células de cria de operárias/machos) notamos que proporcionalmente, nas células reais o alimento ocupa uma maior porção do volume interno (65,7%) do que nas células de cria de operárias/machos (55,6%) (figura 9).

Figura 9: Comparação entre a proporção “volume de alimento/volume não preenchido” do interior das células de cria de *Tetragonisca angustula*.

Ao analisarmos o conteúdo protéico de amostras de alimento larval e células de cria de operárias/machos, notamos que não há diferenças qualitativas entre os alimentos coletados a partir de células de cria de operárias/machos e células reais de *T. angustula* (figuras 10 e 11), porém, é bastante visível a diferença deste com o alimento proveniente de células de cria de operárias/machos de *S. aff. depilis* (figura 10).

Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (7,5%) corado com Nitrato de Prata, contendo amostras das bandas protéicas de alimento larval. MA: marcador de alto peso molecular, MB: marcador de baixo peso molecular, ET: extrato total de duas operárias de *T. angustula*, RT₁ e RT₂: alimento de duas células reais de *T. angustula*, OT₁ e OT₂: alimento de células de cria de operárias/machos de duas colônias diferentes de *T. angustula*, OS₁ e OS₂: alimento de células de cria de operárias/machos de duas colônias diferentes de *S. aff. depilis*. kDa: peso molecular em quilo-Daltons.

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-Page (7,5%) corado com Azul de Comassie, contendo amostras das bandas protéicas de alimento larval. MA: marcador de alto peso molecular; MB: marcador de baixo peso molecular; ET: extrato total de duas operárias de *T. angustula*; O₁, O₂, O₃ e O₄: alimento de células de cria de operárias/machos de quatro colônias diferentes de *T. angustula*; R₁, R₂ e R₃: alimento de três células reais de *T. angustula*.

Para análise de duas amostras pareadas e relacionadas, testamos:

Aminoácidos totais (rainhas x operárias): (ANOVA; $F = 0,4550$; $p = 0,9308$, portanto, $p > 0,05$) mostrando que não há diferenças significativas entre as amostras, além disso a correlação testada pelo coeficiente de *Spearman* foi igual a 0,9912, denotando uma alta correlação entre as amostras.

Aminoácidos livres (rainhas x operárias): (ANOVA; $F = 1,0837$; $p = 0,4392$, portanto, $p > 0,05$) mostrando que não há diferenças significativas entre as amostras. A correlação testada pelo coeficiente de *Spearman* foi igual a 0,7430, denotando que as amostras são correlacionadas.

Assim, a análise da quantidade de aminoácidos livres e totais em amostras de alimentos larvais mostra que não há diferenças entre os alimentos coletados a partir de células de cria de operárias/machos e células reais de *T. angustula* (tabela VII).

Tabela VII: Quantificação dos aminoácidos totais e livres dos alimentos larvais de células reais (rainha) e células de operárias/machos (operária) de uma colônia de *Tetragonisca angustula*. A Pro coelui com a amônia, por isso não foi quantificada. AA: aminoácido.

AA	Operária HCl AA total	Rainha HCl AA total	Operária EtOH AA livre	Rainha EtOH AA livre	AA
Asp+Asn	16,24	16,49	0,31	0,30	Asp
Glu+Gln	11,47	9,96	1,18	0,97	Glu
Ser	6,48	6,31	0,48	0,34	Ser
Gly	5,45	5,31	0,05	0,00	Gly
His	5,28	5,36	0,59	0,40	His
Arg	7,32	7,72	0,68	0,48	Arg
Thr	4,96	5,21	0,18	0,12	Thr
Ala	7,47	6,57	0,42	0,26	Ala
Pro	-	-	-	-	Pro
Tyr	2,14	2,52	0,95	0,67	Tyr
Val	9,37	8,96	0,31	0,20	Val
Met	2,72	2,65	0,04	0,02	Met
Cys	1,08	1,71	0,02	0,01	Cys
Ile	8,20	8,11	0,45	0,49	Ile
Leu	11,90	11,51	0,44	0,32	Leu
Phe	6,89	6,47	0,53	0,30	Phe
Lys	10,38	10,98	0,07	0,83	Lys
mg/mL	117,35	115,86	7,34	5,73	µg/µL

DISCUSSÃO

Segundo Castilho-Hyodo (2001), em *Schwarziana quadripunctata*, a quantidade de alimento depositado nas células de cria varia ao longo do ano, sendo maior em estações do ano com maior disponibilidade de recursos alimentares. Em contraposição, a condição da colônia, em relação ao tamanho populacional e quantidade de potes de alimento, parece não influenciar na quantidade de alimento larval nas células de cria. Já em *Melipona quadrifasciata* e *Plebeia remota*, as operárias provenientes de colônias fracas são menores que operárias de colônia fortes, provavelmente por causa da diminuição na quantidade de alimento depositado nas células de cria nas colônias fracas (Ramalho *et al.*, 1998; Ribeiro & Manoel, 2002).

Baptistella (2009) observou variação sazonal do volume de alimento contido nas células de cria de operárias/machos de *Frieseomelitta varia* entre duas épocas do ano, que a autora intitulou de estação seca (maio, junho e agosto), quando a quantidade de alimento depositado nas células foi menor e estação chuvosa (novembro, fevereiro e abril), quando a quantidade de alimento depositado nas células foi maior. Menezes (2010) também encontrou variação sazonal na quantidade de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos de *Scaptotrigona aff. depilis*; a primavera (outubro) foi a estação com maior quantidade de alimento depositado nas células de cria, enquanto o outono (abril) e inverno (julho) apresentaram menores quantidades de alimento.

Em consonância com os dois trabalhos citados anteriormente, que foram realizados na mesma região (Ribeirão Preto) que o presente trabalho, verificamos para *T. angustula*, a ocorrência de uma variação do volume de alimento larval contido nas células de cria de operárias/machos entre os meses de coleta, sendo março o mês com maior quantidade e julho o mês com menor quantidade de alimento. Os resultados reforçam a idéia de que as variações nas condições climáticas influenciam a quantidade de alimento depositado nas células de cria de operárias/machos. Na região de Ribeirão Preto, onde foi realizado o trabalho, há predominância de um verão muito quente e úmido e um inverno com temperaturas amenas e muito seco.

A variação na quantidade de alimento aprovisionado nas células de cria está diretamente relacionada à disponibilidade de alimento estocado e à densidade

populacional da colônia, e indiretamente à disponibilidade de recursos florais, que por sua vez depende dos fatores ambientais, uma vez que as abelhas coletam quantidades maiores ou menores de recursos alimentares (néctar e pólen) de acordo com a sua disponibilidade na natureza. A quantidade de alimento e a densidade populacional da colônia são interdependentes.

A hipótese é que em períodos mais frios e secos e com menor oferta de recursos alimentares ocorra diminuição na quantidade de alimento larval fornecido à cria, em comparação com períodos mais quentes e com maior disponibilidade de recursos alimentares. Conforme o alimento vai se tornando escasso, as operárias investem menos na alimentação das larvas, depositando menores quantidades de alimento por célula para continuar atendendo as necessidades da colônia e produzindo um mínimo aceitável de indivíduos. Assim, elas produziriam operárias menores com menor gasto de recursos nos períodos de estresse.

Um resultado inédito encontrado neste trabalho mostrou que para as células reais de *Tetragonisca angustula*, a quantidade de alimento depositado não sofre variação sazonal, embora o volume total (capacidade total) varie significativamente. Embora a quantidade de alimento das células de operárias/machos varie sazonalmente, resultando em operárias de tamanhos diferentes, a quantidade de alimento nas células reais não sofre grande variação, resultando em rainhas com tamanhos aproximados. Podemos inferir que embora ocorra variação nas dimensões das células reais e apesar da variação sazonal dos recursos alimentares, as operárias priorizam o aprovisionamento das células reais, quando são construídas, em detrimento às células de operárias/machos, através de um mecanismo fino de controle do aprovisionamento das células reais que garante a formação de rainhas com o mesmo porte em qualquer época do ano.

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

teoria, produzindo rainhas de *Scaptotrigona postica* a partir de quantidades excessivas de alimento larval.

Para *T. angustula* encontramos um volume total médio de alimento larval em células de operárias/machos, igual a $7,85 \pm 0,8 \mu\text{l}$; e para as células reais igual a $51,5 \pm 2,2 \mu\text{l}$, ou seja, as larvas que se tornam rainhas ingerem cerca de $43,5 \mu\text{l}$ a mais de alimento que as larvas de operárias e machos, o que resulta numa proporção é de aproximadamente 1:6,5. Se compararmos com outras espécies como *Scaptotrigona aff depilis* onde a proporção de alimento é de 1:4 ($130 \mu\text{l}$ em células reais e $31 \mu\text{l}$ em células de operárias/machos) (Menezes, 2010) e *Frieseomelitta varia* onde a proporção é de 1:1,3 ($35 \mu\text{l}$ ingerido pelas larvas de rainhas e $26,7 \mu\text{l}$ em células de operárias/machos) (Baptistella, 2009), notamos que em *T. angustula* a diferença na quantidade de alimento oferecido às larvas é muito grande e se reflete no peso e tamanho dos indivíduos adultos, por isso as rainhas de *T. angustula* são extremamente maiores que suas operárias, quando comparado a outras espécies.

Outro fato interessante está na diferença da forma entre as células de cria, pois as células de cria de operárias/machos possuem aproximadamente uma forma cilíndrica, enquanto as células reais possuem forma arredondada. A célula real com uma forma aproximadamente esférica possui menor relação entre “área superficial / volume”, maximizando o volume interno (capacidade total), em relação às outras células de cria, o que permite a deposição de um grande volume de alimento, garante espaço suficiente para o desenvolvimento da futura rainha, economizando, contudo espaço externo (no favo de cria como um todo). Devido ao seu maior tamanho e forma diferenciada, as células reais em *T. angustula* são sempre encontradas na borda dos favos de cria, não interferindo no arranjo das outras células de cria do favo, onde as paredes de uma célula são utilizadas na construção das células adjacentes (figura 12).

Embora ocorressem diferenças marcantes na quantidade de alimento entre células de cria de operárias/machos e células reais e até mesmo entre as células de cria de operárias/machos de acordo com a época do ano, os resultados mostraram não haver diferenças quanto à composição protéica e de aminoácidos totais e livres entre os alimentos depositados em células de cria de operárias/machos e células reais, corroborando a hipótese de que a determinação de castas em *Tetragonisca angustula* ocorre devido unicamente à diferença na quantidade de alimento.

Figura 12: Favo de cria em colônia de *Tetragonisca angustula* contendo células de cria em construção (A), células recém-operculadas contendo ovos (B), e uma célula real situada na periferia (C).

Capítulo 3

Capítulo 3

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE RAINHAS DE
Tetragonisca angustula

INTRODUÇÃO

Uma das características mais marcantes na biologia das abelhas sem ferrão é o fato de as operárias depositarem todo o alimento necessário para o desenvolvimento da larva antes do ovo ser depositado pela rainha (Schwarz, 1948; Nogueira-Neto, 1953; Michener 1974; Sakagami, 1982). Depois a célula é operculada pelas operárias e não ocorre contato entre a população adulta e os imaturos. Este processo recebe o nome de aprovisionamento massal (Kerr, 1948; Michener, 1974; Nogueira-Neto, 1997).

As abelhas sem ferrão possuem diferentes estratégias de fornecimento de alimento às suas larvas (Hartfelder *et al.*, 2006), resultado de uma grande variabilidade de mecanismos de determinação de castas e surgimento de rainhas (figura 13) (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). Como as larvas fêmeas são totipotentes, caso recebam a quantidade de alimento acima de um determinado limiar, elas se desenvolvem em rainhas (Camargo, 1972a, b; Campos & Costa, 1989; Campos & Coelho, 1993).

Na maioria das espécies de abelhas sem ferrão, as larvas que originarão operárias e machos são criadas em células de mesmo tamanho, enquanto as larvas que originarão rainhas são criadas em células maiores, chamadas de células reais (figura 13b) (Darchen & Delage-Darchen, 1971). Geralmente são construídas na periferia do favo, possuem forma diferenciada, geralmente esférica ou ovalada, e contém de duas a oito vezes mais quantidade de alimento que as células de operárias e machos (Darchen & Delage-Darchen, 1971; Camargo, 1972a, b; Prato, 2007; Menezes, 2010). Ao que tudo indica não há diferença qualitativa entre o alimento oferecido às larvas que originarão rainhas e aquele oferecido às larvas que originarão operárias, portanto, o fator determinante é somente da quantidade de alimento oferecido às larvas (Kerr *et al.*, 1966; Camargo, 1972a; Hartfelder & Engels, 1989; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990).

Nos gêneros *Frieseomelitta*, *Leurotrigona* e *Plebeia*, as operárias não constroem células reais, mas o sistema de determinação de castas também está relacionado com a quantidade de alimento larval. Nesses dois gêneros, as larvas precisam ingerir o alimento extra de uma célula vizinha acessória para se tornarem rainhas (figura 13c) (Terada 1974; Faustino, 2002; Faustino *et al.* 2002). Uma peculiaridade dessas espécies é que as células de cria são arrançadas em cachos e quando as colônias estão órfãs, as operárias constroem células apenas com alimento ao lado de células com larvas para que essas se

alimentem e se tornem rainhas, como também foi observado em *Plebeia lucii* (Teixeira & Campos, 2005).

No gênero *Melipona*, rainhas, operárias e machos são criados em células de mesmo tamanho, não existindo, portanto as células reais. A taxa de produção de rainhas e operárias é determinada geneticamente, porém auxiliado pela alimentação larval que tem um efeito modulador sobre essa decisão, assim até 25 % das abelhas fêmeas que emergem podem se tornar rainhas. (figura 13a) (Kerr, 1948, 1950, 1969b; Kerr & Nielsen, 1966; Kerr *et al.*, 1966; Ratnieks, 2001). Então o sinal primário para determinação de castas parte da própria larva (Kerr, 1950, 1969b; Bourke & Ratnieks, 1999). Atualmente existem duas hipóteses em diferentes níveis de explicação sobre a alta produção de rainhas nesse gênero, uma em nível causal (Kerr, 1950; Kerr *et al.*, 1966) e a outra em nível funcional (Ratnieks, 2001; Wenseleers *et al.*, 2003). Em outros gêneros (*Plebeia*, *Nannotrigona*, *Schwarziana*) onde normalmente as rainhas emergem de células reais, rainhas miniatura também podem ser geradas em células de operárias. O mecanismo como isso ocorre é ainda desconhecido, mas segundo Ribeiro *et al.* (2006) seria um mecanismo intermediário entre (a) e (b) apresentados na figura 13. De modo geral, as rainhas-miniaturas são viáveis, acasalam-se e realizam posturas normalmente (Ribeiro & Alves, 2001; Ribeiro *et al.*, 2003; Wenseleers *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2006), embora elas possuam menos ovaríolos que as rainhas produzidas em células reais (Camargo, 1974; Cruz-Landim *et al.*, 1998). Atualmente, têm-se registro de ocorrência de rainhas miniaturas em nove espécies de abelha sem ferrão, entre elas: *Cephalotrigona capitata* (Schwarz, 1948); *Schwarziana quadripunctata* (Camargo, 1974; Imperatriz-Fonseca & Darakjian, 1993; Nogueira-Ferreira *et al.*, 2000; Wenseleers *et al.*, 2005), *Plebeia julianii* (Juliani, 1962), *Plebeia remota* (Ribeiro *et al.* 2003; Ribeiro *et al.*, 2006), *Nannotrigona testaceicornis* (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1997); *Plebeia lucii* (Teixeira & Campos, 2005).

Ainda existem muitas questões para serem estudadas sobre a determinação de castas nas abelhas sem ferrão (Hartfelder *et al.*, 2006). Porém, de acordo com os conhecimentos atuais, todos os sistemas de determinação de castas das abelhas sem ferrão estão de uma forma ou de outra, relacionados à alimentação larval.

Figura 13: Mecanismos de produção de rainhas em ninhos de abelhas sem ferrão. (a) mecanismo genético-alimentar presente no gênero *Melipona* onde não há construção de células reais, pois rainhas e operárias emergem de células de cria de tamanhos semelhantes. (b) mecanismo trofogênico presente na maioria dos gêneros de abelhas sem ferrão, onde as rainhas emergem de células reais. (c) mecanismo trofogênico presente em alguns gêneros de abelhas sem ferrão onde o fator determinante é a quantidade de alimento oferecido às larvas, porém a sobrecarga de alimento necessária para uma larva se tornar rainha fica armazenada em uma célula acessória. Linhas espessas = células de rainhas; linhas finas = células de operárias.

Vislumbrando este panorama, podemos crer que nas abelhas onde a determinação de castas ocorre exclusivamente por meio de mecanismo alimentar, é possível induzir a produção de rainhas por meio da manipulação da quantidade de alimento oferecida às larvas. A possibilidade de obter rainhas manipulando experimentalmente a alimentação das larvas tem intrigado pesquisadores há bastante tempo. Camargo (1972a, b) foi pioneira nesses estudos e desenvolveu uma técnica para criar larvas de abelhas sem ferrão *in vitro* sob condições controladas, baseada nos métodos existentes para *Apis mellifera*. A metodologia consiste na transferência de larvas recém-nascidas de alvéolos naturais para alvéolos artificiais, confeccionados de cera de *A. mellifera*, onde a quantidade de alimento oferecida às larvas é equivalente à quantidade depositada nas células de rainhas. Assim, 100% das larvas fêmeas se tornaram rainhas, com exceção do gênero *Melipona* (Camargo, 1972a, b; Campos & Costa, 1989; Baptistella, 2009). Esses alvéolos são fechados com tampas de cera e mantidos em estufas a 28°C. Ainda, Buschini e Campos (1995) constataram que em *Trigona spinipes* a frequência de rainhas obtidas foi tanto maior quanto maior a

quantidade de alimento ingerido pelas larvas, influenciando o peso, comprimento dos ovários e número de ovariolos.

Os primeiros experimentos foram realizados com a espécie *Scaptotrigona postica*, mas posteriormente outros pesquisadores utilizaram a técnica em diversas espécies (Almeida, 1974; Campos & Costa, 1989; Maciel-Silva & Kerr, 1991; Hartfelder & Engels, 1992; Bezerra, 1995; Menezes, 2006; Prato, 2007; Baptistella, 2009). Apesar destes trabalhos terem sido fundamentais para compreensão dos mecanismos de determinação de castas nas abelhas sem ferrão, alguns aspectos podem ser aprimorados. As rainhas produzidas *in vitro* são, geralmente, menores que as rainhas produzidas naturalmente nas colônias, o método de confecção de alvéolos de cera é muito trabalhoso, o controle de umidade muitas vezes é ineficiente e, conseqüentemente, as taxas de sobrevivência eram baixas. Além disso, até pouco tempo atrás, a utilização da técnica de criação de abelhas *in vitro* ficou restrita aos campos experimentais, focando o estudo da biologia básica das abelhas sem ferrão.

Nas abelhas sem ferrão, a produção de rainhas é um investimento limitado. Apesar de serem produzidas ao longo de todo o ano nas abelhas do gênero *Melipona*, com uma freqüência de até 25%, nos outros gêneros a freqüência é de apenas 1-2% (Kerr, 1946; Kerr, 1948; Kerr, 1950). Esse baixo percentual de fêmeas que se tornam rainhas acarreta uma séria limitação às práticas de manejo que se utilizam da divisão ou multiplicação de colônias com vistas ao aumento do número de colônias e conseqüentemente da produção ou do serviço prestado por estas abelhas. Sob esta perspectiva, o presente estudo teve como objetivo estabelecer e testar modificações nas técnicas de produção de rainhas *in vitro* e verificar sua influência na taxa de sobrevivência das larvas das rainhas em *Tetragonisca angustula*. Além disso, buscamos verificar a possível produção de intercastas e/ou da quantidade mínima limite de alimento larval necessário para induzir a transformação de uma larva fêmea em rainha, através da gradação da quantidade de alimento oferecido às larvas criadas *in vitro*. Atualmente, com o avanço da meliponicultura (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006), essa técnica terá muita importância prática para produção de rainhas em grande escala e, conseqüentemente, na multiplicação de ninhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desta parte do trabalho foram utilizadas dez colônias de *T. angustula* e uma colônia de *Scaptotrigona* aff. *depilis* mantidas em caixas de madeira para criação racional no meliponário do Departamento de Genética da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto -USP. As colônias foram doadoras de material para todas as fases do trabalho, materiais como alimento larval, larvas, favos de cria, etc. É importante ter um número de colônias que permita a realização de uma alternância na retirada de material, para não correr o risco de perder colônias devido ao excesso de manipulação, pois a retirada de material é uma técnica invasiva uma vez que causa queda na taxa de natalidade nas colônias.

Coleta e estocagem do alimento larval

Como o alimento coletado na etapa de medição do volume das células de cria não foi suficiente para a aplicação nas placas de acrílico, foi necessária a coleta de favos de cria recém-operculados na fase embrionária (contendo ovos) e levados ao laboratório onde foram desoperculados (célula por célula) com um estilete de ponta fina. Os ovos foram removidos para que seu conteúdo protéico não interferisse no experimento. Posteriormente, com o auxílio de uma bomba de sucção a vácuo (figura 14), o alimento foi retirado célula por célula de todos os favos, estocado em tubos *Falcon* e acondicionados em freezer a -21°C até o momento de sua aplicação nas placas de acrílico. A coleta individualizada célula a célula evita que o alimento entre em contato com outras partes do ninho ou outras superfícies evitando contaminação.

O alimento utilizado nas placas para alimentação das larvas foi exclusivamente originário de favos de cria de operárias/machos, devido à sua maior abundância em detrimento à baixa quantidade de realeiras encontradas. A utilização de alimento originariamente destinado à alimentação de larvas de operárias/machos na produção de rainhas se torna possível pelo fato de aparentemente não haver diferenças qualitativas entre alimento de realeiras e das células normais de cria (Camargo, 1972a; Hartfelder, 1985).

Figura 14: A) Aparelhagem completa para coleta de alimento larval por sucção, I - bomba de sucção a vácuo, II - recipiente coletor de resíduos, III - tubo *Falcon* coletor de alimento mantido em gelo, IV – ponteira de micropipeta adaptada para sugar alimento do favo. B) Tubo *Falcon* coletor contendo alimento recém-coletado. C) Detalhe da ponteira de micropipeta adaptada para a coleta de alimento célula a célula.

Plaqueamento do alimento larval

Neste estudo, para reproduzir células de cria com as mesmas dimensões das realeiras encontradas naturalmente, utilizamos duas placas de acrílico retangulares com 1,5 cm de espessura e lados com 8,4 cm e 7,6 cm contendo 100 pocinhos cada uma. Cada pocinho possuía 4 mm de diâmetro, 8 mm de profundidade e volume total de 100 μL (figura 15), dimensões aproximadas das realeiras encontradas naturalmente.

O alimento que estava acondicionado em freezer a -21°C foi mantido em temperatura ambiente por cerca de meia hora para descongelamento, agitado e posteriormente transferido com micropipetas para os 200 pocinhos das duas placas de acrílico na quantidade de 55 μL por pocinho, portanto foram utilizados 11,0 mL de alimento larval. Em seguida as placas de acrílico contendo o alimento foram colocadas

em estufa BOD a 28°C e 100% de umidade relativa até o dia seguinte, quando houve transferências das larvas.

Figura 15: Placa de acrílico contendo 100 pocinhos utilizada para a criação *in vitro* de rainhas. Cada pocinho funciona como uma célula real artificial, cada um com 4 mm de diâmetro, 8 mm de profundidade e volume total de 100 μ L.

A manutenção da umidade foi importante para que não houvesse dessecação do alimento que possui consistência líquida. O intervalo de um dia entre transferência do alimento e transferência das larvas foi importante para que houvesse estratificação do alimento, como ocorre naturalmente nas células de cria, uma condição importante para que os ovos e até mesmo larvas flutuem sobre o alimento.

Transferência de larvas para as placas de criação *in vitro*

Larvas em estágios primários de desenvolvimento são geralmente encontradas de 5 a 7 dias após a postura dos ovos, quando ainda não entraram no período de alimentação. Favos de cria contendo larvas em estágio primário foram coletados nos ninhos doadores e levados ao laboratório, onde suas células de cria foram desoperculadas célula por célula com estilete de ponta fina. Em seguida, as larvas foram retiradas de sobre o alimento das células com estilete de ponta fina e imediatamente transferidas para os pocinhos contendo 55 μ L de alimento da placa de acrílico preparada anteriormente. Nesta transferência é preciso extrema acuidade manual para que as larvas não se impregnem muito com alimento e não submerjam no mesmo, tanto no

momento da retirada das células de cria naturais quanto ao serem colocadas sobre o alimento das placas de acrílico, lembrando que as larvas deste estágio se posicionam lateralmente na superfície do alimento, ou seja, com um dos lados voltados para cima (em contato com o ar) por onde realiza as trocas gasosas, e o outro lado voltado para baixo (em contato com o alimento), assim, antes de pescar as larvas de sobre o alimento nas células naturais de cria é importante observar sua posição e conservá-la no momento de depositá-la sobre o alimento das placas de acrílico, pois se houver inversão dos lados a larva será impedida de respirar e morrerá. Outro aspecto que compromete a sobrevivência das larvas são possíveis injúrias causadas no tegumento larval, que é muito sensível, pelo estilete usado para transferi-las, por isso este deve ser liso e não muito pontiagudo.

Acondicionamento dos imaturos em desenvolvimento

Após transferência das larvas, as placas de acrílico de criação *in vitro* eram novamente acondicionadas em estufa BOD a 28°C e 100% de umidade relativa durante quatro dias (figura 16), a manutenção da umidade em 100% foi conseguida por meio de um pequeno vasilhame contendo água, colocado juntamente com as placas e isolados do meio externo por placas de Petri envolvidas com filme plástico. A manutenção da umidade a 100% nos quatro primeiros dias foi importante para evitar a desidratação do alimento, mantendo sua consistência líquida, pois se este se desidrata e torna-se mais viscoso, as larvas não conseguem ingeri-lo. Após os quatro primeiros dias a umidade foi mantida a 75% até as abelhas emergirem. A umidade a 75% foi conseguida mediante substituição da água por uma solução supersaturada de NaCl. Após quatro dias, as larvas já ingeriram todo o alimento de suas células, portanto é desnecessária a manutenção de 100% de umidade, condição que pode estimular a proliferação de fungos sobre as larvas e restos de alimento, portanto, reduzimos a umidade para 75%, que é suficiente para evitar o ressecamento dos tegumentos larval e pupal. A metodologia para manutenção da umidade foi uma modificação da metodologia proposta por Menezes (2010).

Figura 16: Condições de manutenção da placa de acrílico com larvas transferidas na estufa. A) Placa envolvida com filme plástico e recipiente contendo solução salina supersaturada. B) Detalhe de duas larvas recém-transferidas sobre o alimento.

Os procedimentos acima mencionados foram comuns a todos os experimentos abaixo relacionados, porém, explicitaremos as peculiaridades de cada um a seguir.

Experimento 1: Ocorrência de intercastas e quantidade mínima limite de alimento para formação rainhas em *Tetragonisca angustula*.

Utilizamos alimento larval e larvas de *T. angustula* para realização da produção *in vitro*. Realizamos 350 transferências de larvas para pocinhos contendo quantidades variáveis de alimento larval. Utilizamos 50 larvas para cada uma das quantidades de alimento a seguir: 5 μL , 10 μL , 15 μL , 25 μL , 35 μL , 45 μL , e 55 μL . Após a emergência, as análises de enquadramento de castas das fêmeas emergidas foram feitas com base na presença (operárias) e ausência (rainhas) de corbícula, peso, tempo de desenvolvimento pós-embrionário e medidas morfométricas (largura máxima da cabeça, distância entre os olhos e distância entre as tégulas). Os mesmos parâmetros foram avaliados para rainhas ($n=3$) e operárias ($n=15$) recém-emergidas em condições naturais a título de comparação.

Experimento 2: Produção *in vitro* de rainhas de *Tetragonisca angustula* utilizando alimento larval de *Scaptotrigona* aff. *depilis*.

Coletamos alimento larval proveniente de células de cria de operárias/machos de uma colônia de *Scaptotrigona* aff. *depilis* mantida no meliponário do Depto. de Genética da FMRP – USP. Plaqueamos o alimento em uma placa de acrílico contendo 100 pocinhos, cada um contendo 55 µL de alimento e realizamos a transferência de 100 larvas de *Tetragonisca angustula*.

Experimento 3: 1ª produção *in vitro* de rainhas de *Tetragonisca angustula*.

Realizamos 300 transferências utilizando alimento larval e larvas de *T. angustula*, todas na quantidade de 55µL, cujas rainhas emergiram em abril/2009.

Experimento 4: 2ª produção *in vitro* de rainhas de *Tetragonisca angustula*.

Realizamos 200 transferências utilizando alimento larval e larvas de *T. angustula*, todas na quantidade de 55µL, cujas rainhas emergiram em maio/2010.

Após a emergência, as fêmeas emergidas nos experimentos 2, 3 e 4 foram analisadas quanto à presença e ausência de corbícula, peso, tempo de desenvolvimento pós-embrionário e medidas morfométricas (largura máxima da cabeça, distância entre os olhos e distância entre as tégulas). Os mesmos parâmetros foram avaliados para rainhas (n=5) e operárias (n=25) recém-emergidas em condições naturais a título de comparação.

Ao todo realizamos 950 transferências de larvas de *Tetragonisca angustula* objetivando a produção *in vitro* de rainhas, para isso utilizamos 5,5 mL de alimento larval de *Scaptotrigona* aff. *depilis* e 37,0 mL de alimento larval de *Tetragonisca angustula*.

Análise estatística

Para comparação entre os tempos de desenvolvimento e pesos dos diversos grupos de indivíduos naturais e produzidos *in vitro*, utilizamos o teste de *Mann-Whitney* para amostras independentes. Para os mesmos grupos de indivíduos do experimento 1, utilizamos a distância de *Mahalanobis* a fim de comparar as medidas morfométricas. O programa *BioEstat* 5.0 foi utilizado para realizar tais testes estatísticos.

Resultados

Experimento 1: Ocorrência de intercastas e quantidade mínima limite de alimento para formação rainhas em *Tetragonisca angustula*.

A partir de 350 transferências de larvas, conseguimos uma taxa de 7,7% na emergência de indivíduos produzidos *in vitro*, dos quais 14,9% foram rainhas e 85,1% foram operárias. Constatamos que para as quantidades de alimento oferecidas às larvas, as que receberam 35 µL ou menos se tornaram operárias, enquanto aquelas que receberam 45 µL ou mais se tornaram rainhas (tabela VIII).

Tabela VIII: Taxa de emergência de rainhas e operárias em função da variação da quantidade de alimento oferecida às larvas de *Tetragonisca angustula* em criação *in vitro*. * Valores de porcentagem calculados a partir dos indivíduos emergidos (27= 100%).

Vol. de alimento (µL)	Nº de transferências	Natalidade		Rainhas		Operárias	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
5	50	4	8	0	0	4	100
10	50	0	0	0	0	0	0
15	50	0	0	0	0	0	0
25	50	4	8	0	0	4	100
35	50	15	30	0	0	15	100
45	50	3	6	3	100	0	0
55	50	1	2	1	100	0	0
Total	350	27	7,7	4	14,9*	23	85,1*

Comparando o tempo de desenvolvimento pós-embrionário dos indivíduos produzidos *in vitro* e de exemplares produzidos naturalmente em colônias de *T. angustula*, notamos que, na média, os indivíduos produzidos *in vitro* que receberam 45 µL e 55 µL de alimento e se tornaram rainhas, obtiveram um tempo de desenvolvimento muito próximo das rainhas produzidas naturalmente (45 dias). Enquanto os indivíduos produzidos *in vitro* que receberam 35 µL, 25 µL e 5 µL de alimento obtiveram um tempo

de desenvolvimento próximo ao das operárias produzidas naturalmente (40 dias). É possível notar ainda que conforme diminuimos a quantidade de alimento oferecido às larvas, diminui também o tempo de desenvolvimento das mesmas (figura 17). Ao realizarmos o teste de *Mann-Whitney* para o tempo de desenvolvimento de rainhas (rainhas naturais, 55 μ L e 45 μ L) e operárias (operárias naturais, 35 μ L, 25 μ L e 5 μ L), notamos que existe diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,0001$).

Figura 17: Tempo médio de desenvolvimento pós-embrionário de rainhas ($n=3$) e operárias ($n=15$) naturais e dos indivíduos criados *in vitro* ($n=27$) em *Tetragonisca angustula*.

Ao compararmos o peso dos indivíduos produzidos *in vitro* e de exemplares produzidos naturalmente em colônias de *T. angustula* recém-emergidos, notamos que de uma maneira geral as rainhas produzidas *in vitro* (45 μ L e 55 μ L de alimento) possuem um peso bastante inferior àquelas produzidas naturalmente. Entretanto, quando analisamos os indivíduos produzidos *in vitro* entre si, notamos que as rainhas, que receberam 45 μ L e 55 μ L de alimento, possuem um peso bastante acima do obtido pelas operárias, que receberam 35 μ L, 25 μ L e 5 μ L de alimento. É possível notar ainda que conforme

diminuímos a quantidade de alimento oferecido às larvas, assim como ocorreu para o tempo de desenvolvimento pós-embrionário, diminuí também o peso dos indivíduos recém-emergidos (figura 18). Ao realizarmos o teste de *Mann-Whitney* para o peso de rainhas (rainhas naturais, 55 μ L e 45 μ L) e operárias (operárias naturais, 35 μ L, 25 μ L e 5 μ L), notamos que existe diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,0001$).

Figura 18: Peso médio de rainhas ($n=3$) e operárias ($n=15$) naturais recém-emergidas e indivíduos criados *in vitro* ($n=27$) recém-emergidos de *Tetragonisca angustula*.

Realizamos análise dos componentes principais das três medidas morfométricas realizadas tanto nas fêmeas naturais (Rainhas e operárias naturais) quanto nas fêmeas criadas *in vitro* (55 μ L, 45 μ L, 35 μ L, 25 μ L e 5 μ L). Verificamos que a largura máxima da cabeça e a distância entre as tégulas foram as duas variáveis que mais contribuíram para explicar nossos dados, e por isso, foram utilizadas nas análises dos componentes principais (figura 19).

Analisando a figura 19 vemos que existem dois grupos distintos de fêmeas, o primeiro grupo é formado pelas rainhas e compreende as rainhas naturais e aquelas criadas *in vitro* com as quantidades de 55 μ L e 45 μ L de alimento; o segundo grupo é formado pelas operárias e compreende as operárias naturais e aquelas criadas *in vitro*

com as quantidades de 35 μL , 25 μL e 5 μL de alimento. Notamos claramente que as rainhas possuem ambas as medidas (largura máxima da cabeça e distância entre as tégulas) maiores que as operárias. Além disso, percebemos que rainhas e operárias não só diferem quanto ao tamanho, mas também quanto à proporção o que está evidenciado na figura 19 pelas retas de regressão linear de ambos os grupos.

Figura 19: Análise dos componentes principais entre a largura máxima da cabeça (mm) e a distância entre as tégulas (mm) realizadas nos sete grupos formados por fêmeas de *Tetragonisca angustula* criadas *in vitro* com quantidades variadas de alimento: 55 μL , 45 μL , 35 μL , 25 μL e 5 μL e obtidas naturalmente nas colônias: rainhas naturais e operárias naturais. RLO: reta de regressão linear do grupo das operárias, RLR: reta de regressão linear do grupo das rainhas.

As distâncias de *Mahalanobis* das diversas combinações entre os grupos experimentais, tendo como base a largura máxima da cabeça e a distância entre as tégulas podem ser verificadas na tabela IX. Para todas as combinações $p < 0,0001$. A menor distância de *Mahalanobis* foi encontrada entre os grupos de operárias de 35 μL e 25 μL , indicando que estão extremamente próximos; enquanto a maior distância de *Mahalanobis* ocorreu entre as rainhas naturais e as operárias criadas com 5 μL de

alimento, demonstrando que estes grupos são os dois extremos das medidas. De uma maneira geral percebemos pelos valores das distâncias que as combinações das rainhas entre si, assim como das operárias entre si, são baixos indicando que estão próximos.

Tabela IX: Distância de Mahalanobis das combinações existentes entre todos os grupos considerados na análise discriminante: fêmeas de *Tetragonisca angustula* criadas *in vitro* com quantidades variadas de alimento: 55 μ L, 45 μ L, 35 μ L, 25 μ L e 5 μ L e obtidas naturalmente nas colônias: rainhas naturais e operárias naturais, tendo como base as medidas da largura máxima da cabeça (mm) e distância entre as tégulas (mm).

Combinações	Distância de <i>Mahalanobis</i>
Rainhas naturais x Operárias naturais	149,09
Rainhas naturais x 55 μ L	7,00
Rainhas naturais x 45 μ L	19,11
Rainhas naturais x 35 μ L	130,50
Rainhas naturais x 25 μ L	132,07
Rainhas naturais x 5 μ L	191,30
Operárias naturais x 55 μ L	111,42
Operárias naturais x 45 μ L	86,55
Operárias naturais x 35 μ L	1,34
Operárias naturais x 25 μ L	1,61
Operárias naturais x 5 μ L	3,93
55 μ L x 45 μ L	3,11
55 μ L x 35 μ L	92,67
55 μ L x 25 μ L	93,29
55 μ L x 5 μ L	152,55
45 μ L x 35 μ L	68,78
45 μ L x 25 μ L	68,90
45 μ L x 5 μ L	125,14
35 μ L x 25 μ L	0,04
35 μ L x 5 μ L	9,84
25 μ L x 5 μ L	10,42

Para análise da presença ou ausência de corbícula, notamos que em conformidade com os dados morfométricos anteriormente mostrados, as fêmeas mantiveram a formação de dois grupos: as que apresentaram corbículas e portanto são operáras (operárias naturais, e as criadas *in vitro* com 35 μL , 25 μL e 5 μL de alimento), e as que não apresentaram corbículas e portanto são rainhas (rainhas naturais e as criadas *in vitro* com 55 μL e 45 μL de alimento).

Experimento 2: realizamos 100 transferências utilizando alimento larval de *Scaptotrigona aff. depilis*, com 55 μL de alimento larval. As rainhas emergiram em maio/2009. Das 100 larvas transferidas apenas 4 (4%) emergiram.

Experimento 3: realizamos 300 transferências utilizando alimento larval de *T. angustula*, todas na quantidade de 55 μL cujas rainhas emergiram em abril/09. Das 300 larvas transferidas, apenas 21 (7%) emergiram.

Experimento 4: realizamos 200 transferências utilizando alimento larval de *T. angustula*, todas na quantidade de 55 μL cujas rainhas emergiram em maio/2010. Das 200 larvas transferidas, 102 (51%) emergiram.

As análises estatísticas comparando as 4 rainhas produzidas utilizando alimento larval de *Scaptotrigona aff. depilis* com as demais produzidas *in vitro*, demonstraram não haver diferenças significativas entre elas (testes de *Mann-Whitney* para: tempo de desenvolvimento $p < 0,0001$; peso $p < 0,0001$ e medidas morfométricas $p < 0,0001$), portanto, os resultados a seguir dizem respeito aos experimentos 2, 3 e 4 conjuntamente.

Comparando o peso (mg) de rainhas recém-emergidas produzidas *in vitro* e emergidas naturalmente, notamos que não existe diferença significativa entre os grupos, embora as naturais sejam ligeiramente mais pesadas (figura 20) (teste de *Mann-Whitney* com valores significativos para $p < 0,05$, $p = 0,4155$). Para a comparação das medidas morfométricas (mm) entre os mesmos grupos, notamos que as rainhas recém-emergidas produzidas *in vitro* e as emergidas naturalmente formam um mesmo grupo, porém as produzidas *in vitro* são ligeiramente menores que as naturais (figura 21).

Figura 20: Comparação entre os pesos de rainhas naturais (n=3) e rainhas produzidas *in vitro* recém-emergidas, nos experimentos 2, 3 e 4 (n=127).

Figura 21: Comparação das medidas morfométricas entre rainhas naturais e criadas *in vitro* em *Tetragonisca angustula*. A, relação entre largura máxima da cabeça (mm) e distância entre as tégulas (mm); B, relação entre largura máxima da cabeça (mm) e distância entre os olhos (mm).

Discussão

O passo inicial para a realização dos experimentos a cerca da teoria de determinação das castas com base na quantidade de alimento fornecido à larva, é a determinação da quantidade média de alimento oferecido a cada larva que se torna rainha, pois é exatamente a mesma quantidade utilizada em laboratório para a produção *in vitro*. Cada espécie de abelha sem ferrão cuja determinação de castas depende apenas da quantidade de alimento, constrói células reais ou células acessórias de tamanhos diferentes e com quantidades de alimento diferentes, por isso, há a necessidade de averiguar para a espécie escolhida a quantidade média de alimento ingerido pelas larvas que se tornam rainhas, o que no presente trabalho está documentado no capítulo 2.

Os resultados dos experimentos com variação na quantidade de alimento oferecido às larvas de operárias mostram que todos os parâmetros utilizados para realizar o enquadramento dos indivíduos produzidos *in vitro* em uma das castas, utilizando como referências operárias e rainhas recém-emergidas naturalmente nas colônias, corroboraram a divisão em dois grupos, pois todos os indivíduos que ingeriram 5 μ L, 25 μ L e 35 μ L de alimento se tornaram operárias, formando um grupo juntamente com as operárias naturais, e todos os indivíduos que ingeriram 45 μ L e 55 μ L de alimento se tornaram rainhas, formando um grupo com as rainhas naturais. Portanto, deve existir uma quantidade limite de alimento, que se situa entre 35 μ L e 45 μ L acima da qual todos os indivíduos se tornam rainhas e abaixo da qual todos se tornam operárias. Este dado tem uma importância prática muito grande para o manejo avançado de *Tetragonisca angustula* na medida em que nos permite afirmar que a quantidade mínima confiável para realizar produção *in vitro* de rainhas em larga escala é de 45 μ L de alimento larval.

Não houve ocorrência de indivíduos intermediários (intercastas), ou seja, aqueles que conservam características tanto de rainhas quanto de operárias, pois todos os indivíduos se encaixaram em uma das duas castas; assim como não houve a presença de rainhas-miniatura. Segundo Cabral (2009) as rainhas-miniatura de *Scaptotrigona* aff. *depilis* produzidas em experimento *in vitro* possuem tamanho inferior, porém a proporcionalidade é mantida com as rainhas típicas, diferindo das operárias típicas, enquanto no presente trabalho, para *Tetragonisca angustula*, embora o tamanho dos indivíduos produzidos tenha variado de acordo com a quantidade de alimento que

receberam, formaram-se apenas dois grupos muito distintos de acordo com o tempo de desenvolvimento, peso dos indivíduos recém-emergidos, mas principalmente a presença ou ausência de corbícula e as medidas morfométricas, com tamanhos e proporções diferentes, o grupo das operárias e o grupo das rainhas.

Como acontece na maioria dos gêneros de abelhas sem ferrão e diferentemente do que ocorre em *Apis* e *Melipona*, em *T. angustula* o tempo de desenvolvimento pós-embriônico de rainhas é superior ao das operárias, pois rainhas emergem após cerca de 45 dias e as operárias após cerca de 40 dias, tanto que muitas vezes na colônia é possível observar realeiras isoladas dos favos de cria e presas ao invólucro, isso porque as operárias do favo de cria ao qual a célula real estava ligada, já haviam nascido e os favos desmanchados. Quando comparamos o tempo de desenvolvimento pós-embriônico dos indivíduos criados *in vitro* com aqueles que se desenvolveram naturalmente podemos notar que o tempo de desenvolvimento pós-embriônico varia diretamente proporcional à quantidade de alimento oferecida às larvas, quanto maior a quantidade de alimento, maior o tempo de desenvolvimento. Notamos ainda que os indivíduos que ingeriram 55 μL e 45 μL de alimento, cujos emergidos se tornaram rainhas, possuem o tempo de desenvolvimento próximo ao tempo de desenvolvimento das rainhas naturais, enquanto os indivíduos que se alimentaram com 35 μL , 25 μL e 5 μL , possuem tempo de desenvolvimento igual ou abaixo do tempo de desenvolvimento das operárias naturais.

De acordo com os resultados do experimento 2 podemos inferir que é possível utilizar alimento larval de *Scaptotrigona* aff. *depilis* para produzir rainhas de *Tetragonisca angustula*, mesmo havendo diferenças na composição protéica entre os alimentos de ambas as espécies (ver capítulo 2), o que é importante do ponto de vista do manejo, uma vez que podemos tornar menos danosa a retirada de material das colônias da espécie alvo para produção de rainhas, no caso deste estudo *T. angustula*, pois dela retiramos apenas larvas para transferência, ao passo que o alimento pode ser retirado de colônias de outra espécie, mais abundante e que possui maior volume de alimento contido nas células de cria.

Um problema da técnica de criações *in vitro* comumente relatado nos trabalhos é a dificuldade de se obter rainhas de tamanho normal. Hartfelder & Engels (1992) produziram um grande número de rainhas *in vitro* de *Scaptotrigona postica* e além das medidas morfométricas das estruturas corpóreas externas das rainhas, eles avaliaram os

ovários e mostraram que também havia diferenças de tamanho e forma desse órgão, também menores que nas naturais. Essa dificuldade de produzir rainhas de tamanho próximo ao tamanho de rainhas criadas em células reais pode estar relacionada a dois fatores. Primeiro, porque na maioria dos testes realizados foi observado que as larvas sempre deixam um pouco de alimento no fundo da célula, provavelmente por causa do ressecamento do alimento e dificuldades de simular o microambiente das células de cria naturais e segundo devido a algum tipo de estresse causado pelo ambiente artificial, talvez a manipulação excessiva das placas de criação, variações na luminosidade ou até mesmo a falta do contexto social da colônia. O contexto social é um importante fator que varia de colônia para colônia e tem grande influência nas atividades sociais, inclusive na produção de machos, rainhas e operárias, como já visto por Bego (1982) em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica*.

A redução de umidade ao longo do desenvolvimento das larvas já foi utilizada pela primeira vez por Camargo (1972a), sendo adotada por outros autores (Almeida, 1974; Campos & Costa, 1989; Maciel-Silva & Kerr, 1991; Hartfelder & Engels, 1992; Campos & Coelho, 1993; Bezerra, 1995). Contudo, em geral as taxas de sobrevivência eram baixas. Por exemplo, Camargo (1972a) obteve apenas uma rainha a partir de 40 transferências de larvas nos alvéolos que receberam volume de alimento igual ao de células reais. Nos alvéolos que receberam menos alimento, a taxa de sobrevivência foi maior, mas mesmo assim, foi baixa, em torno de 30%. Em geral, as taxas de sobrevivência também foram baixas nos trabalhos realizados posteriormente com criação de larvas *in vitro* e com diferentes espécies (Almeida, 1974; Campos & Costa, 1989; Maciel-Silva & Kerr, 1991; Hartfelder & Engels, 1992; Bezerra, 1995; Prato, 2007; Baptistella, 2009).

Provavelmente, uma das causas para as baixas taxas de sobrevivência está relacionada com a utilização de alvéolos tampados em alguns destes trabalhos, pois a tampa impede o controle adequado da umidade. Por mais que a umidade seja diminuída no dissecador, dentro do alvéolo continuará úmido, causando acúmulo de água dentro das células, podendo matar as larvas. Outro ponto importante, é que as larvas podem comer menos se o controle da umidade não é adequado, por causa do ressecamento do alimento, e isso interfere no tamanho das rainhas produzidas. Ainda relacionado com a umidade, mas também com a assepsia podemos citar problemas de contaminação do alimento larval dos alvéolos com fungos patogênicos, o que tem mais chances de ocorrer

se a umidade é mantida alta (acima de 75%) por um longo período (acima de 4 dias). Por isso, o ideal é a utilização de alvéolos sem tampa, permitindo que a umidade, do recipiente onde as larvas estão sendo criadas, seja controlada por meio de soluções salinas que controlam a umidade num período adequado. Mais recentemente Menezes (2010) em estudo detalhado do controle da umidade para produção *in vitro* de rainhas de abelhas sem ferrão, propôs metodologia de diminuição da umidade ao longo do desenvolvimento dos imaturos, utilizando diferentes soluções salinas, conseguindo uma taxa de sucesso muito alta.

Durante o plaqueamento do alimento e as transferências de larvas devemos adotar práticas de assepsia adequadas para evitar contaminação do alimento e das larvas com microorganismos patogênicos, através da utilização de luvas de látex, máscara, esterilização dos materiais utilizados, principalmente os estiletes de transferência, em UV e/ou álcool 70%, assim como utilizar aparelho de fluxo laminar para realizar tais procedimentos. Um procedimento que ajudou no controle da proliferação de microorganismos patogênicos sobre o alimento dos alvéolos foi a esterilização deste em UV por 5 minutos após plaqueado e logicamente antes de receber as larvas.

Ainda podemos citar as dificuldades de manejar as larvas no momento das transferências e o uso de material inadequado para realizar esta tarefa, pois é necessária grande acuidade manual na hora de “pescar” as larvas e no momento de depositá-las sobre o alimento do alvéolo artificial, de maneira que se não foram tomados os devidos cuidados as larvas podem morrer devido às injúrias causadas em seu tegumento e também por afogamento no alimento larval. Adotando modificações para melhoria da técnica, conseguimos uma taxa de sucesso na obtenção de rainhas de até 51% configurando um grande avanço em relação à taxa natural de emergência de rainhas, cerca de 0,21%.

Estes resultados são animadores e demonstram a eficiência da técnica de produção *in vitro* de rainhas de abelhas sem ferrão (exceto gênero *Melipona*) como uma ferramenta que vem sanar a escassez de rainhas produzidas naturalmente, o que constitui um dos maiores gargalos no momento de realizar multiplicação das colônias.

Capítulo 4

Capítulo 4

MULTIPLICAÇÃO DE COLÔNIAS DE *Tetragonisca angustula*

INTRODUÇÃO

A meliponicultura pode ser considerada uma atividade de desenvolvimento sustentável (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006), com possibilidades de aplicação na polinização de culturas agrícolas (Castro *et al.*, 2006; Slaa *et al.*, 2006), a exemplo do que ocorre em empresas de criação de polinizadores em outros países (Velthuis, 2002; Velthuis & Van Doorn, 2006). O papel efetivo das abelhas sem ferrão na polinização já foi confirmado para pelo menos 18 culturas agrícolas diferentes e sua utilização em estufas foi bem sucedida com 11 de 13 espécies de abelhas testadas (Heard, 1999; Castro *et al.*, 2006; Slaa *et al.*, 2006). A principal limitação para a utilização comercial desses polinizadores é a dificuldade de produção de colônias em larga escala, o que é prejudicado pelas baixas taxas de reprodução natural dessas abelhas (pelo processo de enxameagem) e restrições das técnicas de manejo disponíveis (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). Atualmente existem vários métodos que podem ser empregados na divisão de colônias (Kerr *et al.*, 1996; Nogueira-Neto, 1953, 1997; Heard & Dollin, 2000; Quezada-Euán *et al.*, 2001; Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006; Klumpp, 2007) e todos eles se baseiam na formação de apenas uma colônia filha a partir de uma colônia forte. Assim, considerando um período de recuperação de três meses para a colônia mãe, no máximo quatro colônias-filha podem ser formadas em um ano e nem sempre todas conseguem sobreviver (Kerr *et al.*, 1996; Nogueira-Neto, 1997). Dependendo da espécie e das condições ambientais esse número pode ser ainda menor.

Entre os fatores citados anteriormente que restringem a multiplicação de colônias para a maioria das espécies, pode-se também considerar o baixo número de rainhas (com exceção do gênero *Melipona*), o longo tempo de amadurecimento sexual da nova rainha (Engels & Engels, 1988; van Veen & Sommeijer, 2000) e o lento crescimento das colônias-filhas. A primeira etapa a fim de acelerar esse processo constitui na utilização de rainhas produzidas *in vitro*, pois permite a obtenção de grande número de rainhas em curto período de tempo. O segundo passo será o controle da fecundação dessas rainhas, no ambiente, em confinamento ou artificialmente, garantindo o crescimento de uma mini-colônia até que se torne uma colônia estável e independente.

Será necessário, portanto, contornar os gargalos que impedem a multiplicação de colônias em larga escala por meio do conhecimento detalhado sobre a biologia destas

abelhas, conjuntamente com iniciativas que visem a implementação de novas técnicas de manejo e o melhoramento daquelas já existentes. Nesse contexto, o presente trabalho tem o objetivo de verificar a viabilidade de um novo método de multiplicação de colônias de abelhas sem ferrão, baseado na produção de rainhas *in vitro*, fecundação das mesmas e crescimento de mini-colônias, utilizando para isso *Tetragonisca angustula*.

MATERIAL E MÉTODOS

Montagem de mini-colônias órfãs de *Tetragonisca angustula*

Trinta e nove mini-colônias órfãs foram montadas a partir de seis colônias fortes em épocas diferentes. A montagem de uma mini-colônia órfã trata-se da retirada de dois favos de cria mais velhos contendo pupas e de coloração mais clara, de uma colônia doadora e sua transferência para uma caixa racional de madeira pequena (16 x 14 x 16 cm com tampa de vidro), juntamente com operárias jovens (cerca de 20), cuja função é cuidar dos favos de cria e construir o invólucro (figura 22). Foi fornecido xarope artificial (50% água e 50% açúcar) e pólen fermentado de *Apis* em potes artificiais de cera.

Figura 22: Mini-colônia montada em caixa racional de madeira (16 x 14 x 16 cm com tampa de vidro). A: Vista externa. B: Vista interna de uma mini-colônia já estabelecida com rainha fisiogástrica, I - recipientes contendo xarope artificial, II – pote artificial de cera já aberto contendo pólen fermentado de *Apis mellifera*.

As mini-colônias foram montadas com cerca de uma semana de antecedência à introdução das rainhas virgens, lembrando que o número de rainhas virgens introduzidas em cada mini-colônia variou de 1 até 3 dependendo do experimento. Esse tempo é importante para que as operárias jovens construam um invólucro, protegendo os favos de cria e as operárias comecem a nascer por isso devem-se utilizar favos de cria já na fase

de pupa. Durante este tempo os núcleos devem ficar abrigados e protegidos, pois estão muito frágeis, de preferência devem ser mantidos dentro de estufa a 28°C e 70% de umidade, inteiramente vedados.

Desenvolvimento de mini-colônias de *Tetragonisca angustula* utilizando as rainhas produzidas *in vitro*

Após a criação *in vitro* em estufa, as rainhas virgens produzidas nos experimentos 2, 3 e 4 (ver capítulo 3), foram pesadas em balança eletrônica de precisão Mettler (AE50). Após pesagem as rainhas receberam marcas de coloração vermelha no mesonoto feitas com tinta sem odor e atóxica, e foram imediatamente transferidas para as 16 mini-colônias órfãs previamente construídas, estas foram então transferidas para o meliponário, permitindo o fluxo de entrada e saída dos indivíduos, assim como o vôo nupcial da rainha virgem. Em alguns casos, a fim de evitar o ataque às rainhas virgens produzidas *in vitro*, isolamos estas em gaiolas de proteção adaptadas, constituídas de tubos Eppendorf perfurados manualmente. Este teste consistia em isolar dentro da gaiola de proteção a rainha virgem produzida, um pedaço de algodão embebido em xarope por cerca de 48 horas, tempo suficiente para que as operárias percebessem e aceitassem a presença de uma rainha. Após transferência das mini-colônias órfãs para o meliponário, iniciou-se processo de observação diário dos núcleos e caracterização de parâmetros que possibilitassem a identificação de rainhas que haviam sido fecundadas naturalmente e se tornaram fisogástricas (funcionais), tais como: construção e provisionamento de novas células de cria, atividade de postura e pesos das rainhas introduzidas nas mini-colônias ao longo de seis meses. As rainhas foram pesadas em balança de precisão uma vez por mês durante seis meses, para comparação pesamos também algumas rainhas fisiogástricas dos ninhos naturais mantidos no meliponário. Foram realizadas observações semanalmente durante seis meses a partir da transferência das mini-colônias para o meliponário.

Resultados

Experimento 2: realizamos 100 transferências oferecendo 55µL de alimento larval de *Scaptotrigona* aff. *depilis* para cada larva de *T. angustula*. As rainhas emergiram em abril/2009. Das 100 larvas transferidas apenas 4 (4%) emergiram, todas foram introduzidas em mini-colônias órfãs (uma rainha em cada mini-colônia), fecundadas e se tornaram fisiogástricas (100%). A partir destas rainhas fecundadas obtivemos 3 colônias perenes (tabela X).

Experimento 3: realizamos 300 transferências utilizando alimento larval de *T. angustula*, todas na quantidade de 55µL cujas rainhas emergiram em maio/09. Das 300 larvas transferidas, apenas 21 (7%) emergiram, todas foram introduzidas em 10 mini-colônias órfãs (9 com duas rainhas cada e 1 com três rainhas), das quais 8 (38%) foram fecundadas e se tornaram fisiogástricas. A partir destas rainhas fecundadas obtivemos seis colônias perenes (tabela X).

Experimento 4: realizamos 200 transferências utilizando alimento larval de *T. angustula*, todas na quantidade de 55µL cujas rainhas emergiram em maio/2010. Das 200 larvas transferidas, 102 (51%) emergiram, todas foram introduzidas em 25 mini-colônias (24 com duas rainhas cada e 1 com três rainhas), das quais 11 (10,78%) foram fecundadas e se tornaram fisiogástricas. A partir destas rainhas fecundadas obtivemos sete colônias perenes (tabela X).

Esses períodos foram escolhidos para que houvesse uma sincronia entre a produção de rainhas e a época em que os machos sexualmente maduros existem em maior quantidade no meliponário (ver capítulo 1). Somando os três experimentos, após 600 transferências, conseguimos uma taxa de 21,16% (121 indivíduos) na obtenção de rainhas, destas 19% (23) foram fecundadas e se tornaram fisiogástricas. Das 39 mini-colônias montadas, 16 (41%) se tornaram colônias perenes, com isso conseguimos a formação de 16 colônias perenes a partir de 6 colônias doadoras de material.

Tabela X: Frequência em números absolutos de eventos em cada uma das fases dos três experimentos de produção *in vitro* de rainhas e multiplicação de colônias de *Tetragonisca angustula*.

	Transferências de larvas	Rainhas emergidas	Fecundações	Mini- colônias	Colônias perenes
Experimento 2	100	4	4	4	3
Experimento 3	300	21	8	10	6
Experimento 4	200	102	11	25	7
Total	600	127	23	39	16

Verificamos uma alta taxa de mortalidade das rainhas introduzidas (87,4%) nas mini-colônias (tabela XI). Os fatores responsáveis pela morte das rainhas virgens produzidas podem ser observados na figura 23.

Tabela XI: Rainhas de *Tetragonisca angustula* produzidas *in vitro*, introduzidas, fecundadas e aceitas nas mini-colônias e taxa de mortalidade das rainhas.

	Emergência das rainhas	Rainhas produzidas	Rainhas fecundadas		Mortalidade das rainhas	
			Quant.	%	Quant.	%
Experimento 2	Abril/09	4	4	100	1	25
Experimento 3	Maior/09	21	8	38	15	71,4
Experimento 4	Maior/10	102	11	10,7	95	93,1
Total		127	23	18,2	111	87,4

Quanto às interações entre as rainhas produzidas e as operárias nas mini-colônias, verificamos que muitas operárias apresentaram comportamento agressivo resultando em 75% dos casos, na eliminação das rainhas virgens. Em todos os testes de introdução das rainhas, o tempo de rejeição e conseqüentemente morte das rainhas produzidas não ultrapassou 48 horas. Em alguns casos (18%) as rainhas introduzidas não foram encontradas no interior das novas colônias (figura 23).

Figura 23: Fatores responsáveis pela alta mortalidade das rainhas de *Tetragonisca angustula* produzidas *in vitro*.

Em virtude da agressividade das operárias, testamos a utilização de gaiolas de proteção para isolar as rainhas produzidas *in vitro* (n=10) das operárias da mini-colônia (figura 24). Em 30% dos casos (n=3), em dois dias (± 48 horas) após a introdução das gaiolas de proteção nas mini-colônias, as operárias cobriram completamente a tela das gaiolas com cerume ocasionando a morte das rainhas. Entretanto, no restante dos casos (70%, n=7) as rainhas foram aceitas pelas operárias após um período de 48 horas de aprisionamento.

Figura 24: Tubo *Eppendorf* perfurado utilizado com gaiola de proteção dentro do qual as rainhas virgens (n=10) foram mantidas dentro das mini-colônias por 48 horas.

O estabelecimento da fisiogastria pelas rainhas produzidas *in vitro* foi observado em 23 casos. Depois de passar pela aceitação das operárias, as rainhas produzidas nos experimentos 2, 3 e 4 realizaram o vôo nupcial com sucesso, tendo início a construção e aprovisionamento de novas células de cria, assim como a presença de células operculadas contendo ovos, indicando atividade de postura em 16 mini-colônias (tabela X). Podemos observar pela figura 25 que mostra a média dos pesos das 16 rainhas fisiogástricas desde sua emergência até 6 meses após sua introdução nas mini-colônias, que o maior ganho de peso ocorre no segundo e terceiro meses, com destaque para o segundo mês, enquanto a partir do quarto mês o peso atinge um patamar e se torna estável.

Figura 25: Médias dos pesos de 16 rainhas de *Tetragonisca angustula* produzidas *in vitro* acompanhadas desde a emergência, passando pela fecundação, estabelecimento da fisiogastria, até seis meses após sua introdução em mini-colônias.

Ao compararmos o peso das rainhas produzidas *in vitro* após seis meses de introdução nas mini-colônias com o peso de rainhas fisiogástricas de ninhos naturais percebemos que as naturais possuem, na média, um peso superior (1,5 mg) ao das

produzidas *in vitro* (figura 26). Realizando teste de *Mann-Whitney* para duas amostras independentes, considerando valores significativos $p < 0,05$, notamos que não há diferença significativa entre os pesos de rainhas naturais e rainhas produzidas *in vitro* ($p = 0,1689$).

Figura 26: Comparação entre os pesos das rainhas fisiogástricas de colônias naturais e rainhas fisiogástricas produzidas *in vitro* de *Tetragonisca angustula*. O peso de referência para as rainhas produzidas *in vitro* foi aquele medido após seis meses de introdução em mini-colônias órfãs.

Em média as rainhas produzidas *in vitro* e introduzidas nas mini-colônias órfãs levaram $28 \pm 13,5$ dias a partir de sua emergência para serem fecundadas. O período desde a fecundação das rainhas virgens até o estabelecimento de colônia perene demorou entre 5 e 6 meses.

Discussão

Vários fatores contribuíram para a mortalidade das rainhas produzidas *in vitro* e introduzidas nas mini-colônias, aqueles relacionados ao ataque de inimigos naturais (7%), como formigas, forídeos e a espécie de abelha cleptoparasita *Lestrimelitta limao*, e em alguns casos em particular na morte de toda a população das mini-colônias. Em 18% dos casos as rainhas não foram encontradas no ninho, provavelmente ao saírem para realizar o vôo nupcial, ou o vôo de reconhecimento da colônia possam ter sido predadas ou então não conseguiram localizar a colônia de origem. Entretanto é interessante notar que as operárias foram responsáveis pela morte das rainhas introduzidas, em 75% dos casos, o que provavelmente está relacionado com a capacidade de reconhecimento entre os indivíduos do ninho, precisamente entre as operárias e a nova rainha virgem, uma vez que os insetos sociais exalam compostos que funcionam como assinaturas químicas individuais carregando informações a respeito da casta, idade, sexo e status reprodutivo (Howard & Blomquist, 2005). O reconhecimento ocorre através de duas etapas principais: a liberação de uma pista pelo animal e o reconhecimento dela por um segundo indivíduo (Beecher, 1982). Os insetos sociais não são uma exceção à regra, o que pode ser facilmente entendido ao observarmos que, após uma rápida “antenação” as operárias são capazes de identificar os companheiros do ninho.

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

Nunes (2008) demonstrou que rainhas naturais recém emergidas de *Frieseomelitta varia* não possuem 16 compostos característicos presentes na cutícula de rainhas fisogástricas, em contrapartida apresentam 2 compostos que não são encontrados nos adultos. Os indivíduos de *F. varia* reconhecem pistas indesejadas no perfil cuticular daqueles não companheiros do ninho, e essas pistas são as responsáveis pela rejeição dos indivíduos. Nessa proposta, a aceitação se dá não pela presença das pistas desejadas, mas sim pela ausência das indesejadas (Couvillon & Ratnieks, 2008; Nunes, 2008). Os diversos odores presentes em uma colônia são absorvidos pela cera, e redistribuída por ela formando um odor homogêneo dentro do ninho. Breed *et al.*

(1995), estudando a cera das abelhas melíferas, concluíram que ela é o componente com maior importância na formação do padrão de hidrocarbonetos presentes na cutícula destas abelhas. Seguindo esta mesma linha, acredita-se que o cerume em colônias de *F. varia* também atue como unificador de compostos químicos presentes na colônia, por este motivo as rainhas produzidas em laboratório foram expostas a pequenas quantidades de cerume para que adquirissem o odor característico da colônia, na tentativa de auxiliar no processo de reconhecimento destas operárias. Segundo Nunes (2008) em experimentos de reconhecimento e análises químicas realizadas com indivíduos de *F. varia*, ocorre transferência de pistas utilizadas no reconhecimento através de um breve contato com o cerume. As análises químicas para os indivíduos que permaneceram por 10 minutos em contato com o cerume mostrou que a concentração de alguns compostos mudou, e outros foram adquiridos. Quanto às interações rainha virgem – operárias, verificamos uma grande inquietação por parte das rainhas introduzidas que se movimentavam rapidamente no interior da colônia e eram intensamente assediadas pelas operárias. Este comportamento está de acordo com Imperatriz-Fonseca & Zucchi (1995) que observaram este comportamento em rainhas virgens de abelhas sem ferrão não pertencentes ao gênero *Melipona*.

Conforme demonstrado no capítulo 1, a produção de machos de *Tetragonisca angustula* nas colônias do meliponário onde realizamos os experimentos é sazonal com maior taxa no período de fevereiro a abril, estando os machos sexualmente ativos em sua maioria no período de março a maio, por isso os experimentos de produção *in vitro* de rainhas foram sincronizados com esse período para que houvesse uma maior probabilidade dessas rainhas serem fecundadas, o que provavelmente contribuiu para o aumento da taxa de rainhas fecundadas (18,2%).

Após a emergência das rainhas produzidas *in vitro*, observamos que elas levaram em média $34 \pm 8,5$ dias para serem fecundadas. Embora não tenhamos observado diretamente o vôo nupcial das rainhas produzidas que se estabeleceram nas mini-colônias (n=16), consideramos que elas haviam sido fecundadas a partir da observação da construção, aprovisionamento e presença de novas células operculadas, assim como da atividade de oviposição, fato confirmado através de observações diretas sobre a morfologia externa das rainhas, precisamente a visível dilatação da região abdominal. Segundo Ferreira (1993), a construção das primeiras células de cria está relacionada com

o estímulo do vôo nupcial da rainha, a partir do qual estas estruturas começam a ser construídas após a fecundação da rainha. van Veen e Sommeijer (2000) observaram que rainhas virgens de *Tetragonisca angustula* demoraram entre dois e cinco dias após o vôo nupcial para iniciar postura de ovos.

O tempo médio para que ocorresse a fecundação das rainhas desde sua emergência ($34 \pm 8,5$ dias), está em concordância com o perfil de ganho de peso das mesmas ao longo do tempo, pois observamos que o peso se mantém praticamente estável (ganho de apenas 5,5% com base no peso inicial) até o primeiro mês, pois a maioria das rainhas ainda não foi fecundada, e que aumenta vultosamente a partir do segundo mês (ganho de 52,5% com base no peso inicial), coincidindo com a fase após a fecundação e início da postura de ovos, até atingir um valor estável por volta do quinto mês quando constatamos um ganho de 90,8% com base no peso inicial. Outro fato que corrobora a viabilidade das rainhas produzidas *in vitro* é a igualdade de peso entre estas após atingir a fisiogastria e as rainhas naturais fisiogástricas.

O novo método de multiplicação possui um potencial significativo em relação aos métodos tradicionais, pois seis colônias de *T. angustula* produziram 16 colônias-filha, em período relativamente curto, seis meses. Utilizando métodos tradicionais, cada colônia mãe usada no experimento poderia formar no máximo duas colônias filhas no mesmo período (Nogueira-Neto, 1953; Kerr *et al.*, 1996; Heard & Dollin, 2000; Quezada-Euán *et al.*, 2001; Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006; Klumpp, 2007). Portanto, as seis colônias mães gerariam 12 filhas com os métodos tradicionais. Esse número é inferior ao número de colônias obtidas com o novo método (16 colônias-filha), o que já representa um ganho de 33% de produtividade.

A utilização da técnica de criação de rainhas *in vitro* esbarrava em um obstáculo crucial, a incerteza sobre a capacidade dessas rainhas de formar colônias. Camargo (1972a) foi a primeira a mostrar que rainhas produzidas *in vitro* são capazes de formar colônias. A autora realizou um experimento com *Scaptotrigona postica* de forma semelhante ao presente trabalho, utilizando cinco rainhas. Duas foram mortas pelas operárias, duas voaram e não voltaram e uma conseguiu retornar à sua colônia e iniciar postura. Além desse trabalho, Prato (2007) conseguiu formar uma colônia de *Tetragonisca angustula* com rainha produzida *in vitro*, Baptistella (2009) formou seis colônias de *Frieseomelitta varia* com rainhas *in vitro*, e Menezes (2010) conseguiu a

formação de 5 colônias de *Nannotrigona testaceicornis* e 16 de *Scaptotrigona aff. depilis* com rainhas *in vitro*. O presente estudo mostrou, com um número razoável de observações (16 novas colônias), que as rainhas produzidas *in vitro* estão aptas a formar colônias e realizar oviposição normalmente. Esses dados representam um avanço muito importante para futuras pesquisas que dependem de grande número de rainhas em curtos períodos de tempos.

Quando pensamos em multiplicação de colônias de abelhas sem ferrão, podemos diagnosticar dois importantes gargalos que impedem a prática em larga escala, que são o baixo número de rainhas produzidas naturalmente nas colônias e a capacidade do estabelecimento de mini-colônias em ninhos perenes. O primeiro problema já foi solucionado pela produção *in vitro* de rainhas conforme mostrado no capítulo 3, pois as rainhas podem ser produzidas em uma taxa muito superior àquela natural e são comprovadamente viáveis. Porém o segundo problema, que seria a fecundação natural destas rainhas após serem introduzidas em mini-colônias órfãs, carece de estudos e técnicas mais apuradas, pois ainda temos uma perda muito grande de rainhas entre o momento de introdução destas nas mini-colônias e o vôo nupcial, o que tem muito a ver com a aceitação dessas rainhas pelas operárias do ninho (agressividade das operárias) e também, logicamente com a não fecundação dessas rainhas. Tentando solucionar estes problemas, propusemos a utilização de gaiolas de proteção das rainhas virgens por 48 horas o que se mostrou efetivo em 70% dos casos, pois aumentam as chances de aceitação destas rainhas pelas operárias conforme já foi discutido no início deste tópico.

Menezes (2010) mostrou que é possível realizar fecundação de rainhas em ambientes confinados, colocando-se alguns machos e uma rainha virgem. Vislumbrando este panorama poderíamos supor que esta técnica viria a aumentar muito nossa taxa de sucesso no estabelecimento de colônias perenes. Estes passos seriam um avanço sem igual, pois pouparia as rainhas de alguns inconvenientes como a saída da colônia para realização do vôo nupcial, quando pode sofrer predação ou até mesmo se perder, ao passo que estando já fecundada, provavelmente sua aceitação pelas operárias seria maior e sua saída no ninho seria desnecessária, eliminando as incertezas quanto à probabilidade de fecundação natural destas rainhas e até mesmo as preocupações quanto à abundância de machos no ambiente.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

- AIDAR, D. S. 1997. Meliponicultura e ecossistema: Preservação, formação de colônias, manejo e alimentação de meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: **Ann. Simpósio Paranaense de Apicultura**. Guarapuava: 12: 49-55.
- AIDAR, D. S. 1999. **Coleta de ninhos de Jataí (*Tetragonisca angustula*)**. Paracatu: Fundação Acangau. 32 p.
- ALEXANDER, B. A. & C. D. MICHENER. 1995. Phylogenetic studies of the families of short-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Sci. Bull.** 55: 377-424.
- ALMEIDA, M. G. 1974. Aspectos bionômicos, ecológicos e genéticos da abelha *Melipona scutellaris*, Latreille (1811). **Tese de Doutorado**, USP, Ribeirão Preto, 128pp.
- ALVES, D. A. 2004. Produção de operárias, rainhas e machos em *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Apidae, Meliponini). **Trabalho de conclusão de curso**, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.
- ALVES, D. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & SANTOS-FILHO, P. S. 2009. Production of workers, queens and males in *Plebeia remota* colonies (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), a stingless bee with reproductive diapause. **Genet. Mol. Res.** 8 (2): 672-683.
- ALVES, D. A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2005. One year-study on the production of sexuals in a stingless bee species, *Schwarziana quadripunctata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). In: **Abstracts handbook of association for tropical biology and conservation**, p. 103.
- BAPTISTELLA, A. R. T. O. 2009. Produção “in vitro” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia* (Apidae: Meliponina). **Dissertação de Mestrado**, USP, Ribeirão Preto, 70pp.
- BEECHER, M. D. 1982. Signature systems and kin recognition. **Am. Zool.** 22: 477-490.
- BEGO, L. R. 1977. Aspectos da regulação social em *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 180pp.
- BEGO, L. R. 1982. On social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille, with special reference to male production cycles (Hym., Apidae, Meliponinae). **Bol. Zool.**, São Paulo 7: 181-196.
- BEGO, L. R. 1990. On social regulation in *Nannotrigona (Scaptotrigona) postica* Latreille, with special reference to productivity of colonies (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Bras. Entomol.** 34: 721-738.
- BEIG, D. 1972. The production of male in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. **Jour. Apic. Res.** 11 (1): 33-39.
- BEZERRA, J. M. D. 1995. Aspectos da reprodução de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). **Dissertação de Mestrado**, UFV, Viçosa, 65pp.
- BOLELI, I. C.; PAULINO-SIMÕES, Z. L.; BITONDI, M. M. G. 1999. Cell death in ovarioles causes permanent sterility in *Frieseomelitta varia* worker bees. **J. Morphol.** 242 (3): 271-82.

- BOLELI, I. C.; PAULINO-SIMÕES, Z. L.; BITONDI, M. M. G. 2000. Regression of the lateral oviducts during the larval adult transformation of the reproductive system on *Melipona quadrifasciata* and *Frieseomelitta varia*. **J. Morphol.** 243: 141 – 151.
- BOURKE, A. F. G. 1988. Worker reproduction in the highly eusocial Hymenoptera. **Quart. Rev. Biol.** 63: 291-311.
- BOURKE, A. F. G. & RATNIEKS, F. L. W. 1999. Kin conflict over caste determination in social Hymenoptera, **Behav. Ecol. Sociobiol.** 46: 287–297.
- BREED, M. D. & STILLER, T. M. 1992. Honey bee *Apis mellifera*, nestmate discrimination: Hydrocarbon effects and the evolutionary implications of comb choice. **Anim. Behav.** 43: 875-883.
- BREED, M. D.; *et al.* 1995. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. **Anim. Behav.** 50: 489-496.
- BROTHERS, D. J. 1975. Phylogeny and classification of the aculeate Hymenoptera, with special reference to Mutillidae. **University of Kansas Sci. Bull.** 50: 483-648.
- BROTHERS, D. J. 1999. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). **Zool. Scripta**, Oslo, 28: 233-249.
- BUSCHINI, M. L. T. & CAMPOS, L. A. O. 1995. Caste determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae): influence of the available food and the juvenile hormone. **Rev. Brasil. Biol.** 55: 121 -129.
- CABRAL, G. C. P. 2009. Efeitos da quantidade de alimento larval sobre a determinação de castas da abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) – uma análise morfométrica, de expressão gênica e de títulos de hormônio juvenil. **Dissertação de Mestrado**, USP, Ribeirão Preto, 84pp.
- CAMARGO, C. A. 1972a. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae). **Rev. Brasil. Biol.** 32 (1): 133-141.
- CAMARGO, C. A. 1972b. Produção “in vitro” de intercastas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). In: **Homenagem a W. E. Kerr**, Rio Claro-SP, Brasil, p. 37-45.
- CAMARGO, C. A. 1976. Determinação de sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). **Tese Doutorado**, USP, Ribeirão Preto, SP, 76p.
- CAMARGO, J. M. F. 1974. Notas sobre a morfologia e biologia de *Plebeia (Schwarziana) quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae: Meliponinae). **Studia Ent.** 17(1): 433-470.
- CAMARGO, J. M. F. 1989. Comentários sobre a sistemática de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). **XIV Simpósio Anual ACIESP (Suplem.)**, São Carlos, Anais, 68: 41-61.
- CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. R. M. 1992. Systematics, phylogeny, and biogeography of the Meliponinae: a mini review. **Apidol.** (23): 509-522.

- CAMARGO, J. M. F. & POSEY, D. A. 1990. O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): Notas adicionais. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Ser. Zool.** p. 6-17.
- CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. M. R. 2007. Meliponini, Lepelletier, 1836. In: **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. (J. S. Moure, D. Urban & G. A. R. Melo, Orgs). Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, p. 272-578.
- CAMILLO-ATIQUE, C. 1977. Estudo da variabilidade etológica de *Friesella* incluindo a caracterização de espécies crípticas (Hymenoptera, Meliponinae). **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 203 pp.
- CAMPOS, L. A. O. & COSTA, M. A. 1989. Determinação do sexo em abelhas XXVIII. Determinação das castas em *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae). **Ver. Bras. Biol.**, 49(4): 999-1001.
- CAMPOS, L. A. O. & COELHO, C. D. P. 1993. Determinação de sexo em abelhas. XXX. Influência da quantidade de alimento e do hormônio juvenil na determinação das castas em *Partamona cupira helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Bras. Zool.**, 10(3): 449-452.
- CARRECK, N. L. & WILLIAMS, I. H. 1998. The economic value of bees in the UK. **Bee World** 79: 115-123.
- CASTILHO-HYODO, V. C. C. 2001. Rainha ou operária? Um ensaio sobre a determinação de castas em *Schwarziana quadripunctata* (Lepelletier, 1836) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Tese de Doutorado**, USP, São Paulo, 133pp.
- CASTRO, M. S.; *et al.* 2006. Bee management for pollination purposes: Stingless bees. In: **Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices** (Imperatriz-Fonseca, V.L.; Saraiva, A.M.; De Jong D., eds.). Holos Editora, Ribeirão Preto, p. 75-88.
- CHINH, T. X.; *et al.* 2003. Patterns of male production in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Meliponini). **Apidol.** 34: 161-170.
- CHINH, T. X. & SOMMEIJER, M. J. 2005. Production of sexuals in the stingless bee *Trigona (Lepidotrigona) ventralis flavibasis* Cockerell (Apidae, Meliponini) in northern Vietnam. **Apidol.** 36: 493-503.
- CONTEL, E. P. B. & KERR, W. E. 1976. Origin of males in *Melipona subnitida* estimated from data of an isozymic polymorphic system. **Genét.** 46: 271-277.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. 1979. Observações sobre atividades de machos de *Plebeia droryana* Friese (Apidae, Meliponinae). **Rev. Bras. Entomol.** 24: 177-191.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLI, D. S. 1991. Análise pollinique, propriétés physicochimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. **Apidol.** p. 22-61.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. *et al.* 2006. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidol.** 37 (2): 275-292.

- CORTOPASSI-LAURINO, M. 2007. Drone congregations in Meliponini: what do they tell us. **Biosci. Jour.**, Uberlândia, 23 (Supplement 1): 153-160.
- COUVILLON, M. J. & RATNIEKS, F. L. W. 2008. Odour transfer between colonies of the stingless bee *Frieseomelitta varia* demonstrates that entrance guards use an “undesirable-absent” cue recognition system. **Behav. Ecol. and Sociobiol.** 62: 1099-1105.
- CRAIG, R., 1980. Sex investment ratios in social Hymenoptera. **Am. Nat.** 116: 311–323.
- CRANE, P. R.; FRIIS, E. M. & PEDERSEN, K. R. 1995. The origin and early diversification of angiosperms. **Nat.** 374: 27-33.
- CRUZ-LANDIM, C.; REGINATO, R. D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1998. Variation on ovariole number in Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) queen’s ovaries, with comments on ovary development and caste differentiation. **Pap. Avul. Zool. (S. Paulo)** 40: 289-296.
- CRUZ–LANDIM, C. 2000. Ovarian development in Meliponinae bees (Hymenoptera: Apidae) the effect of queen presence and food on worker ovary development and egg production. **Genet. and Mol. Biol.** 23 (1): 83-88.
- DARCHEN, R. & DELAGE-DARCHEN, B. 1971. Le déterminisme des castes chez les Trigones (Hyménoptères, Apidés). **Insect. Soc.** 18: 121-134.
- DE GROOT, A. P. & VOOGD, S. 1954. On the ovary development in queenless worker bees (*Apis mellifica* L.). **Exper.** 10: 384–385.
- ENGELS, E. & ENGELS, W. 1984. Drohnen-ansammlungen bei nestern der stachellosen biene *Scaptotrigona postica*. **Apidol.** 15(3):315-328.
- ENGELS, E. & ENGELS, W. 1988. Age-dependent queen attractiveness for drones and mating in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. **Jour. of Apicult. Resear.** 27: 3-8.
- ENGELS, W. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1990. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: ENGELS, W. (ed.), **Social insects**, Springer-Verlag, Berlin. p. 167-230.
- FAUSTINO, C. D.; *et al.* 2002. First record of emergency queen rearing in stingless bees. **Insect. Soc.** 49: 111-113.
- FAUSTINO, C. F. 2002. Mini-colônias de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) e sua utilização na solução de problemas bionômicos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 67 p.
- FERREIRA, F. H. N. 1993. Aspectos da estratégia reprodutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 40pp.

- FREITAS, G. S.; *et al.* 2007. Abelhas para melhor idade: Curso de meliponíneos, alfabetização técnica para a conservação. **Biosci. Jour.**, 23: 82-88.
- GAMBOA, J. G.; *et al.* 1996. Kin recognition in social wasps: combining chemicals and behavioral evidence. **Anim. Behav.** 51: 625-629.
- GRIMALDI, D. 1999. The co-radiation of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. **Ann. of the Missouri Bot. Gard.** 86: 373-406.
- GROSSO, A. F. & BEGO, L. R. 2000. The production of males in queenright colonies of *Tetragonisca angustula angustula* (Hymenoptera, Meliponinae). **Sociobiol.** 35: 475-485.
- HARTFELDER, K. 1985. Composition of larval food in the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Mitteilungen Der Deutschen Gesellschaft Für Allgemeine Und Angewandte Entomologie** 4: 339-341.
- HARTFELDER, K. & ENGELS, W. 1989. The composition of larval food in stingless bees: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insect. Soc.** 36 (1): 1-14.
- HARTFELDER, K. & ENGELS, W. 1992. Allometric and multivariate analysis of sex and caste polymorphism in the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. **Insect. Soc.** 39: 251-266.
- HARTFELDER, K. *et al.* 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidol.** 37 (2): 144-163.
- HEARD, T.A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. **Ann. Rev. of Entomol.**, 44: 183-206.
- HEARD, T. A. & DOLLIN, A. E. 2000. Stingless bee keeping in Australia: snapshot of an infant industry. **Bee World**, 81: 116-125.
- HOWARD, R. W. & BLOMQUIST, G. J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of arthropod hydrocarbons. **Ann. Rev. of Entomol.** 50: 371-393.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 1973. Miscellaneous observations on the behaviour of *Schwarziana quadripunctata* (Hym. Apidae, Meliponinae). **Biol. Zool. Biol. Mar.** 30: 633-640.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; *et al.* 1984. Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Bolm. Zool. Univ. S. Paulo.** p. 8-15.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & DARAKJIAN, P. 1993. Notas sobre o comportamento das rainhas virgens de *Schwarziana quadripunctata* (Apidae, Meliponinae). **Cienc. Cult.** 45: 912.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & ZUCCHI, R. 1995. Virgin queens in stingless bees (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. **Apidol.** 26: 231-244.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CRUZ-LANDIM, C. & MORAES, R. L. M. S. 1997. Dwarf gynes in *Nannotrigona testaceicornis* (Apidae, Meliponinae, Trigonini), behaviour, exocrine gland morphology and reproductive status. **Apidol.** 28: 113-122.

- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & KLEINERT, A. M. P. 1998. Worker reproduction in the stingless bee *Friesella schrottkyi* (Apidae, Meliponinae). **Entomol. General.** 23(3): 169-175.
- JULIANI, L. O. 1962. Aprisionamento de rainhas virgens em colônias de Trigonini (Hymenoptera, Apoidea). **Bolm. Univ. Paraná** 20 (6): 1-11.
- KEARNS, C. A. & D. W. INOUE. 1997. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. **BioSci.** 47:297 – 307.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D.W. & WASER, N.M. 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. **Ann. Rev. of Ecol. and Syst.** 29: 83-112.
- KERR, W. E. 1946. Formação de castas no gênero *Melipona* (Illiger 1806). **An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz"** 3: 299-312.
- KERR, W. E. 1948. Estudos sobre o gênero *Melipona*. **An. Esc. Sup. Agr. "Luiz de Queiroz"** 5 (2): 181-276.
- KERR, W. E. 1950. Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. **Genetic.** 35: 143-152.
- KERR, W. E. & LAIDLAW, H. 1956. General genetics of bees. **Advanc. in Genet.** 8: 109-153.
- KERR, W. E.; *et al.* 1962. Reproduction in the social bees. **J. N. Y. Entomol. Soc.** 70: 265-276.
- KERR, W. E. & NIELSEN, R. A. 1966. Evidence that genetically determined *Melipona* queens can become workers. **Genetic.** 54: 859-865.
- KERR, W. E.; STORT, A. C. & MONTENEGRO, M. J. 1966. Importância de alguns fatores ambientais na determinação das castas do gênero *Melipona*. **An. Acad. Bras. Ciênc.** 38: 149-168.
- KERR, W. E. 1969a. Some aspects of the evolution of social bees (Apidae). In: DOBZANSKY, T. (ed.) **Evolutionary biology**, s. 1., M. K. Hetch & Steends 3 (1): 119-75.
- KERR, W. E. 1969b. Genética e melhoramento de abelhas. In: KERR, W. E. (org.) **Melhoramento e genética**. São Paulo: Edusp. p. 263-297.
- KERR, W. E. 1996. **Biologia e manejo da tiúba: a abelha do Maranhão**. EDUFMA. São Luis, MA. 156pp.
- KERR, W. E.; CARVALHO, G. A. & NASCIMENTO, V. A. 1996. **Abelha urucu: biologia, manejo e conservação**. Ed. Fundação Acangau, Paracatu – MG. 144 p.
- KEVAN, P. G. & BAKER, H. G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. **Ann. Rev. Ent.**, 28: 407-53.
- KLUMPP, J. 2007. **Australian stingless bees: a guide to sugarcane beekeeping**. Earthling Enterprises, Brisbane, 120p.
- KOEDAM, D. 1995. Behavioural and physiological implications of queen dominance in stingless bees. Utrecht: Universiteit Utrecht. 109 p.
- KOEDAM, D. *et al.* 2001. The behaviour of laying workers and the morphology and viability of their eggs in *Melipona bicolor bicolor*. **Physiol. Entomol.** 26 (3): 254-259.

- KOEDAM, D.; *et al.* 2005. How queens and workers share in male production in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini). **Insect. Soc.** 52: 114-121.
- KREMEN, C., WILLIAMS, N. M. & R. W. THORP. 2002. **Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification**. Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A., 99: 16812-16816.
- LACERDA, L. M. 2000. Morfometria e morfologia de ovos e aspectos relacionados à reprodução de *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Moure, 1942) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 73 p.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nat.** 227 (5259): 680-685.
- LAIDLAW H. H. 1992. Production of queen and package bees, In: **The hive and the honey bee** (GRAHAM J., Ed.), Dadant & Sons, Hamilton, IL, USA. pp. 989-1041.
- LOCKEY, K. H. 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Compar. Biochem. and Physiol.** 89: 595-645.
- MACIEL-SILVA, V. L. & KERR, W. E. 1991. Sex determination in bees. XXVII. Castes obtained from larvae fed homogenized food in *Melipona compressipes* (Hymenoptera, Apidae). **Apidol.** 22(1): 15-19.
- MALAGODI-BRAGA, K. S. & KLEINERT, A. M. P. 2004. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be used as strawberry pollinator in greenhouses? **Aust. J. of Agric. Res.** 55 (7): 771-773.
- MELO, G. A. R. 1999. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. **Sci. Pap. Nat. Hist. Mus. University of Kansas** 14: 1-55.
- MELO, G. A. R. & GOLÇALVES, R. B. 2005. Higher-level bee classifications (Hymenoptera, Apoidea, Apidae sensu lato). **Rev. Bras. Zool.** 22(1): 153-159.
- MENEZES, C. 2006. Determinação de castas no gênero *Melipona* (Hymenoptera, Apidae): Influência do alimento larval. **Monografia**. UFU, Uberlândia-MG, 36p.
- MENEZES, C. 2010. A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Tese de Doutorado**, USP, Ribeirão Preto, 97pp.
- MICHENER, C. D. 1948. The generic classification of the Anthidiine bees (Hymenoptera, Megachilidae). **Amer. Mus. Novitates** 1381: 1-29.
- MICHENER, C. D. 1974. **The social behavior of the bees**. Cambridge, Mass., Harvard Univ. Press. 404 p.
- MICHENER, C. D. 1979. Biogeography of the bees. **Ann. of Missouri Bot. Gard.** 68: 301- 323.

- MICHENER, C. D. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera). **The University of Kansas Sci. Bull.** 54 (4): 75-164.
- MICHENER, C. D. 2000. **The bees of the world**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 913 p.
- MOO-VALLE, H.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. & WENSELEERS, T. 2001. The effect of food reserves on the production of sexual offspring in the stingless bee *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponini). **Insect. Soc.** 48: 398-403.
- NIJHOUT, H. F. & WHEELER, D. E. 1982. Juvenile Hormone and the Physiological Basis of Insect Polymorphisms. **The Quart. Rev. Biol.** 57 (2): 109-133.
- NOGUEIRA-FERREIRA, *et al.* 2000. Morphometric study in *Schwarziana quadripunctata* with emphasis on virgin queens (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Sociobiol.** 35: 99-108.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1953. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Editora Tecnapis, São Paulo.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1997. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis. 446 p.
- NUNES, T. M. 2008. Reconhecimento parental em abelhas eussociais Neotropicais (Hymenoptera: Apinae, Meliponini): uma análise dos mediadores químicos e seus determinantes em *Frieseomelitta varia*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 52 pp.
- O'TOOLE, C. 1993. Diversity of native bees and agroecosystems. In: J. LaSalle & I. Gauld (Editors) **Hymenoptera and Biodiversity**, Commonwealth Agricultural Bureau International, London, pp. 69–106.
- OLIVEIRA, R. C. *et al.* 2004. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. **Genet. Mol. Biol.** 27 (2): 181-186.
- OSTER, G. F. & WILSON, E. O. 1978. **Caste and Ecology in the Social Insects**. Princeton, Princeton University Press, 352 p.
- PAGE, R. E. & PENG, C. Y. S. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Exp. Gerontol.** 36: 695–711.
- PAMILO, P. 1991. Evolution of colony characteristics in social insects. II. Number of reproductive individuals, **Am. Nat.** 138 – 412p.
- PAXTON, R. J.; *et al.* 2003. Low mating frequency of queens in the stingless bee *Scaptotrigona postica* and worker maternity of males. **Behav. Ecol. Sociobiol.** 53: 174-181.
- POTTS, S. G., *et al.* 2005. Role of nesting resources in organising diverse bee communities in a Mediterranean landscape. **Ecol. Entomol.** 30: 78–85.
- PRATO, M. 2007. Produção artificial de rainhas em *Tetragonisca angustula* Latreille 1811 (Hymenoptera, Apidae). **Monografia**, USP, Ribeirão Preto, 57pp.

- PROCTOR, M.; YEAO, P.; LACK, A. 1996. **The natural history of pollination**. London, Harper Collins Publishers, 479p.
- QUEZADA-EUÁN, J. J. G.; MAY-ITZA, W. J.; GONZALES-ACERETO, J. A. 2001. Meliponiculture in Mexico: problems and perspectives for development. **Bee World**, 82: 160-167.
- RAMALHO, M.; IMPERATRIZ- FONSECA, V. L. & GIANNINI, T. C. 1998. Within-colony size variation of foragers and pollen load capacity in the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Apidae, Hymenoptera). **Apidol.** 29: 221-228.
- RATNIEKS, F. L. W. 2001. Heirs and spares: caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, 50: 467-473.
- RIBEIRO, M. F. & ALVES, D. A. 2001. Size variation in *Schwarziana quadripunctata* queens (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Rev. Etol.**, 3(1): 59-65.
- RIBEIRO, M. F. & MANOEL, D. J. A. 2002. Workers' body mass and colony condition in *Plebeia remota* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). In: **Anais do V Encontro sobre Abelhas**. Ribeirão Preto, 327p.
- RIBEIRO, M. F.; SANTOS-FILHO, P. S. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2003. Exceptional high queen production in the Brazilian stingless bee *Plebeia remota*. **Stud. Neotrop. Fauna & Environment**, 38(2): 111-114.
- RIBEIRO, M. F.; *et al.* 2006. Miniature queens in stingless bees: basic facts and evolutionary hypotheses. **Apidol.**, 37: 191-206.
- ROUBIK, D. W. 1983. Nest and colony characteristics of stingless bees from Panamá (Hymenoptera, Apidae). **J. Kans. Entomol.** 56 (327): 17-25.
- ROUBIK, D. W. 1989. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, Massachusetts. 248 p.
- SÁ, N. P. & PRATO, M. 2007. Conhecendo as abelhas: um projeto de ensino. **Biosci. Jour.**, 23: 107-110.
- SAKAGAMI, S. F.; *et al.* 1963. Occurrence of ovary-developed workers in queenright colonies of stingless bees. **Rev. Bras. Biol.** 23 (2): 115-129.
- SAKAGAMI, S. F. & ZUCCHI, R. 1966. Estudo comparativo do comportamento de várias espécies de abelhas sem ferrão, com especial referência ao processo de aprovisionamento e postura das células. **Ciênc. e Cult.** 18: 283-296.
- SAKAGAMI S. F. & ZUCCHI, R. 1968. Oviposition behavior of an Amazonic stingless bee *Trigona (Duckeola) ghiliani*. **Jour. Fac. Scienc. Hokkaido University Series VI, Zool.** 16: 564-581.
- SAKAGAMI, S. F. 1982. Stingless bees. In: **Social Insects** (Hermann H.R., ed.). Academic Press, New York, 361-423.

- SAKAGAMI, S. F.; *et al.* 1983. Nest architecture and colony composition of the Sumatran stingless bee *Trigona (Tetragonula) laeviceps*. **Kont.** 51 (1): 100-111.
- SANTOS-FILHO, P. S.; *et al.* 2006. Numerical investment in sex and caste by stingless bees (Apidae: Meliponini): a comparative analysis. **Apidol.** 37: 1-15.
- SCHWARZ, H. F. 1948. Stingless bees of the western Hemisphere. **Bull. Amer. Mus. Natur. Hist.**, 90:i-xviii, 546pp.
- SILVA, D. L. N.; ZUCCHI, R. & KERR, W. E. 1972. Biological and behavioral aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Anim. Behav.** 20: 123-132.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R. & ALMEIDA, E. A. B. 2002. **Abelhas brasileiras: Sistemática e Identificação**. Fundação Araucária, Belo Horizonte. 253pp.
- SLAA, E. J.; *et al.* 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidol.** 37: 293-315.
- SNODGRASS, R. E. 1956. **Anatomy of the honey bee**. Comstock publishing associates, New York, 334 p.
- SOMMEIJER, M. J.; VAN ZEIL, M. & DOHMEN, M. R. 1984. Morphological differences between worker – laid eggs from a queenright colony and queenless colony of *Melipona rufiventris paraensis* (Hymenoptera: Apidae). **Entomol. Berich.** 44 (1): 91-95.
- SOMMEIJER, M. J. & BUREN, N. J. M. VAN. 1992. Male production by laying workers in queenright colonies of *Melipona favosa* (Apidae, Meliponinae), In: Billen J. (Ed.), **Biology and Evolution of Social Insects**, Leuven Univ. Press, p. 89-97.
- SOMMEIJER, M. J. 1994. Reproduction strategies and feeding ecology of stingless bees in relation to environmental problems. In: Lenoir, A.; G. Arnold & M. Lepage, Eds., **Les Insectes Sociaux**, Publ. Univ. Paris-N: 19.
- SOMMEIJER, M. J.; CHINH, T. X. & MEEUWSEN, F. J. A. J. 1999. Behavioural data on the production of males by workers in the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae, Meliponinae). **Insect. Soc.** 46: 92-93.
- SOUTHWICK, E. E. & L. SOUTHWICK. 1992. Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera Apidae) as agricultural pollinators in the United States. **Econ. Entomol.** 85: 621 – 633.
- SUKA, T. & INOUE, T. 1993. Nestmates recognition of the stingless bee *Trigona (Tetragonula) minangkabau* (Apidae: Meliponinae). **Jour. Ethol.** 11: 141-147.
- TEIXEIRA, L. V. & CAMPOS, L. A. O. 2005. Produção de rainha de emergência em *Plebeia lucii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina). **Simpósio Brasileiro de Insetos Sociais**, CD-ROM.
- TERADA, Y. 1974. Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona mulleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 96 pp.

- TERADA, Y. 1980. Estudos bionômicos em colônias de *Plebeia (Plebeia) droryana* Friese 1900 (Hymenoptera, Meliponinae) na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 185pp.
- THORP, R. W. 1979. Structural, behavioral, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 66: 788-812.
- TÓTH, E.; *et al.* 2002. Genetic and behavioral conflict over male production between workers and queens in the stingless bee *Paratrigona subnuda*. **Behav. Ecol. Sociobiol.** 53: 1-8.
- TÓTH, E.; *et al.* 2004. Conflict over male parentage in stingless bees. **Insect. Soc.** 51: 1-11.
- van VEEN, J. W. & SOMMEIJER, M. J. 1990. Tropical beekeeping: the production of males in stingless bees (Melipona). Amsterdam: NEV, **Proc. Exper. & Appl. Entomol.** 1: 171-176.
- van VEEN, J. W.; ARCE, H. G. & SOMMEIJER, M. J. 1992. Brood production in *Melipona beecheii* in relation to dry season foraging. In: **Biology and Evolution of Social Insects**, J. Billen Editor, Leuven University Press, p. 81-88.
- van VEEN, J. W.; SOMMEIJER, M. J. & MONGE, L. A. 1999. Behavioural development and abdomen inflation of gynes and newly mated queens of *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponinae). **Insect. Soc.** 46:361-365.
- van VEEN, J. W. & SOMMEIJER, M. J. 2000. Observations on gynes and drones around nuptial flights in the stingless bees *Tetragonisca angustula* and *Melipona beecheii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Apidol.** 31: 47 - 54.
- VELTHUIS, H. H. W. 1997. **Biologia das abelhas sem ferrão**. São Paulo: Edusp. 33 p.
- VELTHUIS, B. J. & VELTHUIS, H. H. W. 1998. Columbus surpassed. Biophysical aspects of how stingless bees place an egg upright on their liquid food. **Naturwiss.** 85: 330-333.
- VELTHUIS, H. H. W. 2002. The historical background of the domestication of the bumblebee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture. In: **Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature** (Kevan, P.; Imperatriz- Fonseca, V.L., eds.). Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 177-184.
- VELTHUIS, H. H. W.; KOEDAM, D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2005. Males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. **Apidol.** 36: 169-185.
- VELTHUIS, H. H. W. & Van DOORN, A. 2006. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. **Apidol.** 37: 1-31.
- WEAVER, N. 1966. Physiology of caste determination. **Ann Rec. Entomol.** 11: 79-102.
- WEAVER, N. 1974. Control of dimorphism in the female honeybee: The balance of nutrients. **Jor. Apicult. Research** 13: 93-101.

- WENSELEERS, T.; RATNIEKS, F. L. & BILLEN, J. 2003. Caste fate conflict in swarm-founding social hymenoptera: an inclusive fitness analysis. **Jour. Evolution. Biol.**, 16(4): 647-658.
- WENSELEERS, T.; *et al.* 2004. Queen execution and caste conflict in the stingless bee *Melipona beecheii*. **Ethol.** 110(9): 725-736.
- WENSELEERS, T.; *et al.* 2005. Working-class royalty: bees beat the caste system. **Biol. Letters** 1: 125-128.
- WHEELER, D. E. 1986. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. **The Am. Nat.**, 128(1):13-34.
- WILDE, J. & BEETSMA, J. 1982. The physiology of caste development in social insects. **Advanc. Insect Physiol.** 16: 167-246.
- WILLE, A. 1983. Biology of stingless bees. **Ann. Rev. Entomol.**, 28: 41-64.
- WILSON, E. O. 1971. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press Harvard University. 548 p.
- WING, S. L. & BOUCHER, L. D. 1998. Ecological aspects of the Cretaceous flowering plant radiation. **Annu. Rev. Earth Planet. Sci.** 26: 379-421.
- WINSTON, M. L. 1991. **The Biology of the Honey Bee**. Harvard: Harvard University Press, 281p.
- WIRTZ, P. & BEETSMA, J. 1972. Introduction of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera*) by juvenile hormone. **Entomol. Experiment Appl.** 15: 517-520.
- ZUCCHI, R.; *et al.* 1999. On the cell provisioning and oviposition process (POP) of the stingless bees, nomenclature reappraisal and evolutionary considerations (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Sociobiol.** 34: 65-86.