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

Reconhecimento parental em abelhas eussociais Neotropicais (Hymenoptera: Apinae, Meliponini): uma análise dos mediadores químicos e seus determinantes em *Frieseomelitta varia*.

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

RIBEIRÃO PRETO -SP
2008

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

Reconhecimento parental em abelhas eussociais Neotropicais (Hymenoptera: Apinae,
Meliponini): uma análise dos mediadores químicos e seus determinantes em

Frieseomelitta varia.

Túlio Marcos Nunes
Aluno

Prof. Dr. Ronaldo Zucchi
Orientador

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2008

Agradeço,

Aos meus pais Isabel Cristina Vieira Nunes e Mário Paulo Nunes e irmãos Talita Cristina Nunes, Pablo Henrique Nunes e Isaac Luiz Nunes, por todo o apoio e carinho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucchi, por todo apoio e dedicação durante a realização desse estudo.

Aos Especialistas em Laboratório Izabel Cristina Turatti e Dr. Sidnei Mateus, pelo auxílio técnico indispensável à realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento, pelo apoio e pela minha introdução ao fantástico mundo das abelhas.

Ao Prof. Dr. Norberto Poperine Lopes, pela ajuda nas questões químicas e aulas particulares.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós Graduação em Entomologia, pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

Aos irmãos Faruskas Hérnia, Feio, Loboda e Estevan, pela companhia constante e pelos momentos de descontração.

À Sibila Carvalho e Sérgio Spina, pelo carinho e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Comportamento Animal, Sidnei, Carol, Plésio, Mirri, Dirk, João *Polén Kit*, Cristiano, Patrícia, Denise, Bambi, Amofera, Charalis, Ju Alonso, Lampreia, Solange e Maria Juliana, pela amizade, carinho e cervejas compartilhadas.

À Larissa Galante Elias (Nóia), pelo carinho e leitura da dissertação.

Ao meu primeiro orientando Salsas, pela amizade e entusiasmo demonstrado pelas abelhas.

Aos indivíduos de *Frieseomelitta varia* pelo sacrifício involuntário indispensável à realização desse estudo.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

História Natural

Carlos Drummond de Andrade

Cobras cegas são notívagas.

O orangotango é profundamente solitário.

Macacos também preferem o isolamento.

Certas árvores só frutificam de 25 em 25 anos.

Andorinhas copulam no vôo.

O mundo não é o que pensamos.

**Aos meus pais, Mário e Isabel,
pelo exemplo constante.**

Dedico

Resumo

A capacidade de discriminação entre indivíduos geneticamente relacionados é de fundamental importância na teoria de Hamilton da Seleção Parental. Insetos sociais utilizam-se do olfato no reconhecimento, sendo os compostos presentes na cutícula dos indivíduos os responsáveis por esta mediação. Nesses insetos as pistas utilizadas no sistema de reconhecimento podem provir de diversas fontes distintas, tanto endógenas quanto exógenas. As pistas exógenas podem ser absorvidas a partir de materiais de construção do ninho, alimentos ou da rainha. Apesar de existir uma grande literatura a respeito dessa aquisição em formigas, cupins, abelhas melíferas e abelhas solitárias, pouco se sabe a respeito de abelhas sem ferrão. Dessa forma, o presente estudo teve como principais objetivos a análise da composição química cuticular da abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* (Lepeletier, 1836) e a verificação da influência da alimentação e dos materiais de construção do ninho na formação dos sinais utilizados nos sistemas de reconhecimento e defesa. Foram identificados um total de 48 compostos presentes na cutícula de *F. varia*. Dentre esses compostos os mais comuns foram hidrocarbonetos, divididos em alcanos, alcenos e alcadienos. Os hidrocarbonetos variaram de 21 a 31 átomos de carbono e os encontrados em maiores concentrações foram o heptacosano e o nonacosano. Os compostos variaram de acordo com a casta, o gênero e a idade dos indivíduos. Os testes comportamentais, juntamente com as análises químicas indicaram que os indivíduos absorvem compostos químicos a partir dos materiais do ninho. No entanto, foi mostrado que a convergência alimentar não resulta em uma maior aceitação dos indivíduos nem em uma convergência de compostos cuticulares.

Abstract

The ability to discriminate among genetic related individuals has a main importance in the Kin selection Hamilton's theory. Social insects use odor cues in recognition systems, and the main used cues are compounds present in their cuticle. These cues may originate from endogenous and exogenous sources. The exogenous cues may be absorbed from nest materials, food or even from the queen. There are numerous reports concerning the origin of these cues in ants, termites, honeybees and solitary bees, although, little is known about stingless bees. Therefore, the present work had as main objectives the study of the chemical composition of *Frieseomelitta varia*'s cuticle and the verification of food and nest materials influence in the constitution of the cues used in recognition systems. A total of 48 compounds were identified in the cuticle of *F. varia*. The main compounds were hydrocarbons, divided into alkanes, alkenes and alkadienes. The hydrocarbons varied from 21 to 31 carbon atoms and those found in highest concentrations were heptacosane and nonacosane. The compounds varied between castes, gender and age. The behavioral tests, in agreement with the chemical analyses, showed that the individuals absorb chemical compounds from nest material. However, the results showed that food convergence imply neither in a higher acceptance of the individuals nor in a chemical convergence.

Índice

Introdução.....	1
Materiais e Métodos.....	9
Resultados.....	19
Discussão.....	36
Bibliografia.....	46
Anexos.....	53

1. Introdução

Segundo a teoria de Hamilton, existe uma explicação genética para a evolução do comportamento altruístico e do comportamento social conhecido como seleção parental ou “kin selection”. As idéias propostas por Hamilton foram rapidamente apreciadas e largamente aplicadas, principalmente na compreensão da estrutura social dos himenópteros (Hamilton, 1964a,b; Wilson, 1971). Nessa teoria, a capacidade dos animais em discriminar geneticamente entre indivíduos mais ou menos relacionados representa um papel fundamental na manutenção da estrutura social. Essa capacidade é atualmente conhecida não só nos insetos, mas também em outros grupos de invertebrados e vertebrados (revisado por Gadagkar, 1985).

Os ninhos de insetos sociais apresentam uma grande variação na complexidade de suas estruturas, podendo abrigar uma série de recursos indispensáveis à manutenção da estrutura social, tais como: ovos, larvas, indivíduos jovens, estoques de alimento, entre outros. Nesses casos, a capacidade de reconhecimento entre companheiros de ninho é de fundamental importância, impedindo possíveis danos causados por inimigos naturais, representados tanto por indivíduos da mesma espécie quanto por animais parasitas e cleptobióticos (Wilson, 1971; Hölldobler e Wilson, 1990).

O reconhecimento ocorre através de duas etapas principais: a liberação de uma pista pelo animal e o reconhecimento dessa pista por um segundo indivíduo (Beecher, 1982; Sherman e Holmes, 1985). Tanto em invertebrados como vertebrados, esse reconhecimento é mediado por pistas olfativas (revisado por Hepper, 1986). A utilização de sinais olfativos provavelmente decorre do baixo custo energético, tanto na produção das pistas quanto na recepção e no processamento (Alcock, 1993). Assim como os demais animais, os insetos sociais também se utilizam de sinais químicos no reconhecimento, o que é bastante claro ao observarmos que após uma rápida antenação

os indivíduos são capazes de identificar companheiros e não companheiros de ninho. Diversos estudos químicos e comportamentais confirmam que as pistas utilizadas no reconhecimento são representadas por compostos associados à cutícula dos insetos, sendo a maior parte dos compostos identificados hidrocarbonetos, divididos em alcanos, alcenos e alcanos com ramificação. (Pfennig *et al.*, 1983; Breed e Stiller, 1992; Singer e Espelie, 1992; Gamboa *et al.*, 1996).

Essa relação entre os compostos cuticulares e o reconhecimento de companheiros e não companheiros de ninho torna-se mais clara após os experimentos realizados por Buchwald e Breed (2005) e Nunes *et al.* (2008). Buchwald e Breed (2005) primeiramente testaram a capacidade natural dos indivíduos da abelha sem ferrão *Trigona fulviventrís* discriminarem entre companheiros e não companheiros de ninho. Logo após, verificaram mudanças no padrão de aceitação de indivíduos companheiros de ninho quando tratados com substâncias conhecidas, identificando, dessa forma, alguns compostos que atuam diretamente no reconhecimento. Nunes *et al.*, (2008) verificaram as porcentagens de aceitação de indivíduos de três colônias da abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* em uma quarta colônia da mesma espécie. Os autores verificaram que os indivíduos de uma dentre as três colônias foram aceitos na quarta colônia da mesma forma que os membros desta. Da mesma forma, a análise dos perfis cuticulares mostrou que os indivíduos dessa colônia apresentavam um perfil cuticular igual ao dos indivíduos da colônia discriminante, evidenciando a relação entre reconhecimento e composição química da cutícula.

A cutícula dos insetos é recoberta por uma camada de ceras impermeáveis, constituídas por hidrocarbonetos de alto peso molecular, cuja função primária seria a de proteção contra desidratação (Lockey, 1988). Secundariamente, estes compostos também apresentam funções comunicativas, tais como reconhecimento de espécies,

importantes para a manutenção social e comportamentos relacionados à corte em várias espécies. Nos insetos sociais, conforme citado, esses compostos estão relacionados à discriminação entre companheiros e não companheiros de ninho, reconhecimento de castas, além de apresentar pistas específicas para cada tarefa em execução. Além disso, esses compostos podem indicar dominância e sinalizar fertilidade. Finalmente, uma outra função identificada para tais compostos é a de feromônio utilizado na marcação de trilhas de forrageamento (Howard, 1993; Clément e Bagnères, 1998; Singer *et al.*, 1998; Vander Meer e Morel, 1998; Steinmetz *et al.* 2003; revisado por Howard e Blomquist, 2005).

Nos insetos sociais, cada indivíduo na colônia possui seu próprio perfil de compostos cuticulares, que constitui uma assinatura química individual. Essas substâncias podem ter origem endógena, ou seja, ser produzidas pelo próprio indivíduo, caracterizando uma origem genética; ou apresentar uma origem exógena, sendo adquiridos a partir do meio externo (Carlin, 1989; revisado por Lorenzi *et al.*, 1996).

A origem desses compostos apresenta uma grande variação nos diversos grupos de insetos sociais analisados e, embora possa ser encontrada uma extensa literatura a respeito da origem de tais compostos em formigas, cupins, vespas e abelhas do gênero *Apis*, pouco se conhece a respeito da composição e origem de tais compostos nas abelhas sem ferrão (Meliponini).

Nos demais grupos, os estudos que mais evidenciaram a origem endógena dos odores responsáveis pelo reconhecimento foram, provavelmente, aqueles realizados por Greenberg (1979). O autor mostrou, através de testes comportamentais, que abelhas *Lasioglossum zephyrum* são capazes de discriminar entre indivíduos mais ou menos geneticamente relacionados, aumentando a proporção de aceitação dos indivíduos na mesma medida em que a relação genética aumenta. Similarmente, algumas espécies de

formigas também utilizam tais pistas no reconhecimento interindividual (*Acromyrmex octospinosus*: Jutsum *et al.*, 1979; *Pseudomyrmex ferruginea*: Mintzer, 1982; Mintzer e Vinson, 1985; *Rhytidoponera metallica*: Haskins e Haskins, 1983; *Leptothorax curvispinosus*: Stuart, 1987).

Em abelhas do gênero *Apis*, a poliandria pode levar a presença de 7 a 20 linhagens parentais na mesma colônia (Estoup *et al.*, 1994). Nesse gênero, estudos mostraram que as operárias possuem a capacidade de distinção entre meio-irmãs e irmãs completas, alimentando preferencialmente suas irmãs completas (Moritz e Heisler, 1992). A forma exata de como a distinção de tais indivíduos é realizada ainda é desconhecida. No entanto, Arnold *et al.* (1996) demonstram que as subfamílias apresentam marcas químicas geneticamente determinadas, mostrando que essas abelhas possuem um sistema com capacidade suficiente para essa discriminação. Além disso, Breed (1983) mostrou que em condições experimentais controladas o reconhecimento é realizado, ao menos em parte, baseado em pistas que possuem uma origem pré-emergencial e não adquiridas a partir do ambiente.

Embora os estudos citados acima tenham evidenciado uma capacidade de reconhecimento através de pistas geneticamente produzidas, outros estudos realizados nesse grupo mostraram que essas abelhas também podem obter pistas de reconhecimento a partir do ambiente, e que essas pistas se sobrepõem às genéticas, apresentando um papel decisivo na discriminação entre companheiras e não companheiras de ninho (Downs e Ratnieks, 1999).

As pistas de origem exógena, utilizadas no reconhecimento, podem provir de diversas fontes distintas, dentre elas as fontes de alimentos (*Formica*: Lange, 1960; *Solenopsis invicta*: Obin e Vander Meer, 1988; *Linepithema humile*: Liang e Silverman, 2000), materiais utilizados na construção do ninho (*Bombus*: Free, 1961; *Pogonomyrex*

badius: Hangartner *et al.*, 1970; *Solenopsis invicta*: Hubbard, 1974; *Polistes*: revisado por Gamboa, 1996) ou, ainda, a rainha pode ser a responsável pelo odor da colônia (*Camponotus*: Carlin e Hölldobler, 1983; 1986; *Leptothorax lichtensteini*: Provost, 1985, 1987; *Myrmica*: Brian, 1986).

Partindo dos resultados obtidos por Gamboa *et al.* (1986a,b), os quais mostraram o papel fundamental dos materiais dos ninhos no perfil de hidrocarbonetos em *Polistes*, Breed *et al.* (1995) estudaram a influência da cera na formação do padrão dos hidrocarbonetos em *Apis mellifera* e chegaram à conclusão de que a cera é o componente com maior importância na formação do padrão dos hidrocarbonetos presentes na cutícula. Nessas abelhas, o contato com a cera de um segundo ninho por, pelo menos, 5 minutos resultou em um aumento significativo na porcentagem de rejeição dos indivíduos (Breed *et al.*, 1995). Também, a troca de cera entre duas colônias resultou em um aumento significativo na porcentagem de aceitação entre essas colônias. Além da verificação comportamental, análises químicas mostraram que após a troca da cera entre as duas colônias, o perfil químico dos indivíduos pertencentes às duas colônias também variou, resultando em uma maior proximidade química. A porcentagem de aceitação, no entanto, foi regularizada em cerca de três semanas, indicando, também, que os sinais do reconhecimento são constantemente renovados (D'Ettorre, 2006). Baseado nesses estudos, os autores propõem que os diversos odores presentes em uma colônia são absorvidos pela cera e redistribuídos pela mesma, formando, dessa forma, um odor homogêneo (Breed *et al.*, 1995).

Um outro dado interessante a respeito dos mecanismos de reconhecimento em abelhas do gênero *Apis* é o fato dos indivíduos recém emergidos serem aceitos em qualquer colônia na qual eles sejam introduzidos. Breed *et al.*, (2004) observaram que nesses indivíduos a quantidade de compostos associados à cutícula é muito menor, e

apontaram evidências de que a aceitação dessas abelhas resulta da ausência de pistas de reconhecimento, as quais, segundo os autores, são adquiridas à medida que o indivíduo envelhece.

Em Meliponini, existem poucos estudos com relação aos compostos cuticulares responsáveis pela comunicação entre os indivíduos. Abdalla *et al.* (2003) analisaram o perfil cuticular da abelha sem ferrão *Melipona bicolor* e identificaram um total de sete compostos, divididos em alcanos lineares, alcanos com ramificação e alcenos. Os compostos encontrados têm de 23 a 29 átomos de carbono e todos apresentam cadeias ímpares. Os autores encontraram ainda, diferenças, tanto qualitativas como quantitativas, no perfil químico cuticular entre diferentes castas e sexos. No entanto, não encontraram diferenças entre operárias recém emergidas e rainhas virgens. Além disso, o perfil cuticular se alterou de acordo com a idade.

Da mesma forma, Jungnickel *et al.* (2004), estudando *Scaptotrigona bipunctata*, encontraram apenas hidrocarbonetos como compostos cuticulares dessas abelhas. Assim como em *Melipona bicolor*, esses compostos são divididos em alcanos, alcenos e alcanos ramificados e também apresentam de 23 a 29 átomos de carbono. A análise do perfil cuticular para essa espécie mostrou claras diferenças entre as duas colônias estudadas e, através de testes comportamentais, foi observada a capacidade de discriminação entre companheiros e não companheiros de ninho (Jungnickel *et al.*, 2004).

Recentemente, Pianaro *et al.* (2007) estudaram as mudanças químicas que ocorrem durante a formação de colônias mistas em abelhas sem ferrão. Foram analisadas uma colônia de abelhas da espécie *Melipona rufiventris* e uma da espécie *Melipona scutellaris*. Nesse estudo, além das alterações ocorridas durante a fase na qual a colônia de *M. scutellaris* foi invadida por indivíduos de *M. rufiventris* foi realizada

toda a caracterização da cera e do batume para as duas espécies quando em condições normais. Esse trabalho caracteriza pela primeira vez os batumes de espécies de abelhas sem ferrão. Os autores listam um grande número de compostos químicos tanto para a cera retirada dos indivíduos das duas espécies quanto para os batumes analisados. Foi identificada uma maior diversidade de hidrocarbonetos com relação aos demais relatos para abelhas sem ferrão, além de outras classes de substâncias. Para o batume foi identificada uma grande quantidade de terpenos. Os testes mostraram que a cera do abdômen das duas espécies são semelhantes, principalmente com relação aos alcanos e alcenos encontrados. Os autores sugerem que essa semelhança é a responsável pela invasão dos indivíduos de *M. rufiventris* na colônia de *M. scutellaris*. Sugerem ainda que a invasão, embora aparentemente pacífica, pode ser caracterizada como uma disputa química entre as espécies, o que é sugerido pelas alterações químicas encontradas na colônia invadida.

Outros estudos, embora também tenham analisado a capacidade de discriminação dos indivíduos em algumas espécies de Meliponini, não tiveram o propósito de investigar a composição dos compostos cuticulares e sua atuação no sistema de reconhecimento (*Melipona quadrifasciata*, *M. scutellaris*, *M. rufiventris*: Breed e Page, 1991; *Tetragonisca angustula*: Bowden *et al.*, 1994; *Tetragonula minangkabau*: Suka e Inoue, 1994; *M. panamica*: Inoue *et al.*, 1999; *Hypotrigona gribodoi*: Kirchner e Friebe, 1999).

Até o presente momento, a origem, constituição química e o papel dos compostos cuticulares nos Meliponini são virtualmente pouco conhecidos em relação a outros grupos de insetos sociais. Desta forma, uma grande área da biologia das abelhas sociais Neotropicais ainda permanece desconhecida. Este estudo é motivado pela oportunidade de se conhecer melhor os compostos químicos cuticulares de abelhas sem

ferrão e compreender a função desses na mediação do reconhecimento intra- e inter-colonial em *Frieseomelitta varia*.

Objetivos

De acordo com o exposto acima, o presente estudo tem como principais objetivos a análise da composição química cuticular da abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* inclusive a verificação de diferenças entre idades, sexos e castas. O estudo visa ainda, verificar a influência da alimentação e dos materiais de construção do ninho na formação dos sinais utilizados nos sistemas de reconhecimento e defesa.

2. Materiais e Métodos

2.1. Colônias e espécie

Para os testes foram utilizadas 10 colônias de *Frieseomelitta varia* acondicionadas em caixas de madeira (35x24x7cm) cobertas por vidro. As colônias foram mantidas no laboratório e estiveram conectadas ao meio externo através de um tubo plástico, de modo que as abelhas podiam sair livremente para forragear.

2.2. Análises comportamentais: abordagem geral dos testes de discriminação entre os indivíduos manipulados experimentalmente.

Os testes comportamentais de discriminação entre os indivíduos foram realizados na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Para a realização dos mesmos foi introduzida uma caixa experimental no tubo que conecta a colônia ao meio externo (Figura 1). A caixa experimental apresenta as medidas 4x5x10cm e sua porção superior é coberta por vidro, possibilitando a visualização de seu interior. À lateral dessa caixa foi conectado um tubo de 1 cm de diâmetro e 4 cm de comprimento para a introdução dos indivíduos a serem testados. O tubo de introdução é aberto para o interior da caixa e possui uma tampa na outra extremidade, evitando, dessa forma, que as demais abelhas presentes na caixa experimental se agitem com a introdução do indivíduo experimental. Antes da introdução, os indivíduos foram coletados e acondicionados individualmente em pequenos frascos de vidro (3.5x2cm). O frasco era, então, colocado em uma caixa de isopor com gelo por cerca de dois minutos para a diminuição da atividade locomotora. Após os dois minutos, a abelha a ser testada era retirada do frasco e inserida na caixa experimental através do tubo lateral. As interações apresentadas entre o indivíduo introduzido e os demais indivíduos da caixa

experimental foram registradas durante cinco minutos. Comportamentos agressivos apresentados pelos guardas como mordidas nas pernas e asas, imobilização e deposição de resina foram considerados como rejeição, enquanto a ausência de tais comportamentos e a entrada do indivíduo introduzido na colônia foi considerada como aceitação. Foi testada apenas uma abelha por vez e foi respeitado um intervalo de no mínimo 15 minutos entre as introduções. Cada indivíduo coletado foi testado apenas uma vez e a escolha da colônia na qual ele foi inserido ocorreu de acordo com a manipulação experimental executada (ver itens 2.5, 2.6 e 2.7).

Figura 1. Esquema do aparato montado para realização dos ensaios comportamentais.

A. Tubo de entrada. B. Caixa experimental. C. Tubo para introdução dos indivíduos. D. Colônia.

A análise dos dados seguiu o modelo proposto por Breed (2003). O teste do χ^2 foi largamente utilizado na comparação entre os grupos controle e teste dos

experimentos realizados (Sokal e Rohlf, 1995). Todos os testes estatísticos deste projeto foram realizados com auxílio do pacote Statistica for Windows 6.0 (Statsoft, inc).

2.3. Análises químicas: verificação dos padrões de hidrocarbonetos cuticulares

A detecção e identificação das substâncias químicas presentes na cutícula dos indivíduos foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Para as análises, foram extraídos os compostos cuticulares das abelhas, escolhidas de acordo com a manipulação experimental, por meio de banhos em solvente apolar (hexano a 50-500 µl) por 1 minuto. Todos os indivíduos coletados foram acondicionados independentemente em pequenos frascos de vidro (3.5cm x 2.0cm) ou em tubos *ependorf* (1,5 ml) e posteriormente congelados. Antes da extração, as abelhas tiveram o último par de pernas retirado a fim de evitar contaminação com resina, visto que operárias velhas dessa espécie, em geral, são encontradas com grande quantidade desse material. As amostras foram analisadas em um sistema de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas SHIMADZU, modelo GCMS-QP2010, equipado com coluna capilar de silicone (DB-5MS) e utilizando hélio como gás carreador a 1 ml/min. Para a correta identificação dos compostos foram realizadas comparações dos espectros de massa com a biblioteca Wiley e com dados de íons diagnósticos presentes na literatura. Alguns compostos não puderam ser identificados devido à baixa concentração em que foram encontrados. Substâncias presentes em concentrações relativas inferiores a 5% e aquelas presentes em menos de três indivíduos amostrados dentro de um grupo, foram representadas como *Traços* nas tabelas de concentrações relativas. A quantificação foi baseada nas áreas de pico obtidas pelos cromatogramas (Singer *et al.*, 1992). O protocolo de temperatura utilizado foi: 150°C-280°C a uma taxa

de 3°C/min (mantido por 15 min). As análises químicas foram todas realizadas com o auxílio do programa GCMSolutions for Windows (Shimadzu Corporation).

Os dados dos perfis químicos obtidos pelo GC-MS foram, então, comparados entre os grupos experimentais pela análise estatística multivariada. Análise dos principais componentes (PCA) foi usada para se definir os principais picos de compostos a serem comparados. Posteriormente, análise discriminante *stepwise* foi utilizada para se contrastar o perfil químico cuticular dos indivíduos dos grupos experimentais formados. Substâncias ausentes na maior parte dos indivíduos de um grupo foram excluídas das análises estatísticas. Os compostos apontados pela análise dos componentes principais como responsáveis por menos de 5% de contribuição para os dois primeiros fatores dessa análise, não foram utilizados na análise discriminante. Os compostos escolhidos para a análise discriminante foram reajustados para 100%. Para se evitar erros na composição dos dados amostrais (Aitchison, 1986), a área de cada pico apontado pelo cromatograma foi transformada de acordo com a seguinte fórmula:

$$Z = \ln [A_p / g (A_p)]$$

Onde A_p é a área do pico, $g (A_p)$ é a média geométrica do pico em cada grupo de operárias e Z é a área transformada do pico.

2.4. Caracterização do perfil cuticular de *Frieseomelitta varia*

A caracterização do perfil cuticular da espécie *Frieseomelitta varia* foi realizada buscando analisar a maior diversidade encontrada dentro de uma espécie. Para tal, foram utilizadas 20 operárias velhas, identificadas pela coloração escura, 20 operárias

recém emergidas, identificadas pela sua coloração clara e pela atividade que desempenhavam na colônia (S. Mateus *inf. pessoal*). Foram analisados, também, sete machos recém emergidos coletados ainda no interior das colônias e oito machos velhos coletados em uma nuvem de machos formada na entrada de uma das colônias que continha uma rainha virgem. Além disso, foram analisadas seis rainhas virgens e quatro rainhas fisogástricas. As operárias velhas e recém emergidas foram coletadas de quatro colônias distintas. Os machos recém emergidos foram coletados em duas colônias distintas. Como os machos velhos foram coletados em uma nuvem de machos, não foi possível determinar a origem dos mesmos. As rainhas virgens foram coletadas cerca de quatro dias após a emergência e foram produzidas em duas colônias distintas. Cada rainha fisogástrica foi coletada em uma colônia. Após a coleta os indivíduos foram analisados segundo a metodologia descrita no item 2.3. As rainhas coletadas nessas análises não participaram das análises estatísticas em decorrência do pequeno tamanho amostral.

2.5. Análise de indivíduos recém emergidos.

2.5.1. Abordagem química: comparação da composição cuticular de indivíduos recém emergidos entre colônias.

Para a comparação da composição química dos lipídios cuticulares dos indivíduos recém emergidos entre as colônias foram analisadas dez operárias de quatro colônias. Assim como para as análises anteriores, os indivíduos recém emergidos foram identificados pela sua coloração clara e pela atividade que desempenhavam na colônia (S. Mateus *inf. pessoal*). Após a coleta dos indivíduos, esses tiveram seus compostos químicos analisados segundo a metodologia acima descrita.

2.5.2. Abordagem comportamental: verificação da taxa de rejeição de indivíduos recém emergidos.

Foram utilizadas quatro colônias para a realização dos testes de verificação da taxa de rejeição de indivíduos recém emergidos. As colônias foram divididas em dois pares, nos quais, a primeira delas foi responsável por fornecer os indivíduos, recém emergidos e velhos, para os testes de reconhecimento, de acordo com a metodologia descrita no item 2.2, que ocorreram na segunda colônia do par. No total, foram realizadas 15 repetições para cada grupo experimental (recém emergidos e velhos) para cada par de colônias. Os resultados de cada grupo experimental foram analisados em conjunto nos dois pares estudados.

2.6. Verificação da aquisição de pistas de reconhecimento a partir dos materiais de construção do ninho.

2.6.1. Abordagem química: verificação de mudança do perfil cuticular após rápido contato com material de ninho estranho.

Foram utilizadas duas colônias para esses testes. Operárias adultas foram retiradas do interior de uma das colônias e colocadas individualmente em frascos (3.5x2cm) contendo pilares de sustentação (cerca de 2x5mm) confeccionados de cerume retirado do próprio ninho (controle) ou do segundo ninho (teste). Dois grupos experimentais foram formados de acordo com o tempo de permanência em contato com o material. No primeiro, os indivíduos ficaram em contato com o cerume durante dez minutos e, no segundo, por vinte minutos. Para os testes químicos, foram coletadas e analisadas, segundo a metodologia descrita no item 2.3, dez operárias de cada uma das quatro situações experimentais (dez minutos controle e teste, vinte minutos controle e teste).

2.6.2. Abordagem comportamental: verificação de alterações no padrão de reconhecimento após rápido contato com material de ninho estranho.

Os testes comportamentais visando avaliar as alterações no padrão de reconhecimento após um breve contato com material de um ninho estranho seguiu a mesma metodologia descrita acima (item 2.6.1). No entanto, para esses testes, foram utilizados dois pares de colônias. Os indivíduos a serem testados foram retirados de uma das colônias do par e colocados em contato com cerume proveniente da própria colônia (controle) ou proveniente da segunda colônia do par (teste) por dez ou vinte minutos. Após esse tempo de contato, os indivíduos foram testados na colônia de origem segundo a metodologia dos testes de reconhecimento descritos no item 2.2 (Figura 2). Para cada par de colônias foi realizado um total de 120 repetições, sendo 30 repetições para cada grupo experimental (dez minutos controle e teste, vinte minutos controle e teste). Os resultados obtidos para os grupos teste e controle foram analisados em conjunto para os dois pares de colônias.

Figura 2. Esquema dos testes de verificação da aquisição de pistas de reconhecimento a partir da cera.

2.6.3. Abordagem química: verificação de mudança do perfil cuticular após longo contato, isolado da colônia, com material de ninho estranho.

Para a verificação de mudanças no perfil de compostos cuticulares a partir de longo contato com materiais do ninho, foram utilizadas duas colônias de *F. varia*. No total, foram coletados 28 indivíduos recém emergidos de uma das colônias, os quais foram divididos em dois grupos. Cada grupo foi acondicionado em uma pequena caixa (13x6x8cm). Diariamente, foram introduzidas placas de cerume, provenientes de pilares de sustentação, com cerca de 2x2 cm. Um dos grupos recebeu material proveniente de sua própria colônia (controle) enquanto o outro recebeu material da segunda colônia (teste). Ambos os grupos permaneceram nessas condições durante dez dias. Durante esse tempo os indivíduos receberam solução de sacarose *ad libitum*. Após os dez dias, todos os indivíduos foram coletados e analisados segundo a metodologia descrita no item 2.3.

2.7. Verificação da aquisição de pistas de reconhecimento a partir da alimentação.

2.7.1. Abordagem comportamental: verificação de alterações no sistema de reconhecimento através da convergência alimentar.

Nos testes de verificação de alterações no sistema de reconhecimento através da convergência alimentar foram utilizadas seis colônias de *Frieseomelitta varia*. As colônias foram agrupadas em pares, sendo uma das colônias do par chamada de Doadora e a segunda de Receptora. Para cada sessão foram retiradas nove operárias velhas (pigmentadas) da colônia Doadora (teste) e nove da colônia Receptora (controle), as quais foram inseridas individualmente na colônia Receptora para verificar a porcentagem de rejeição de tais indivíduos conforme descrito no item 2.2 dos testes de comportamentais de reconhecimento (Figura 3).

Figura 3. Esquema dos testes de verificação da convergência no perfil dos compostos cuticulares através da convergência alimentar. Teste (A-B, C-D e E-F) e Controle (B-B, D-D e F-F).

Todos os 18 indivíduos de cada par foram testados em um mesmo dia e apenas um par de colônias foi testado por dia. Os demais pares foram testados nos dias subsequentes. Após uma primeira sessão com cada um dos pares, a entrada de todos os ninhos foi fechada e todo o estoque de alimento retirado. As colônias passaram, então, a receber uma dieta artificial, consistindo de xarope (25%) e pólen de *Apis* fermentado, *ad libitum*. As sessões foram repetidas uma vez por semana durante as quatro semanas seguintes. Após os testes, as colônias foram reabertas e os indivíduos passaram dois meses forrageando livremente. Após esse período todo o teste foi repetido alterando-se a função da colônia no par. As colônias que no primeiro teste atuaram como Doadoras passaram a atuar como Receptoras e as Receptoras no primeiro teste como Doadoras no segundo. Para cada semana de teste foi realizada uma média, entre os seis pares, das porcentagens de rejeição observadas.

2.7.2. Abordagem química: verificação dos efeitos da convergência alimentar no perfil dos compostos cuticulares.

Na verificação dos efeitos da convergência alimentar no perfil dos compostos cuticulares foi utilizado o mesmo aparato experimental descrito acima (item 2.7.1). Foram coletados dez indivíduos de um dentre os três pares de colônias estudadas, a cada

sessão de testes comportamentais executada antes da troca de função das colônias. Desse modo foram formados cinco grupos de amostrais, sendo um anterior à retirada do alimento e um para cada uma das quatro semanas subsequentes. Os indivíduos coletados foram analisados segundo sua composição química de acordo com a metodologia descrita no item 2.3.

2.7.3. Abordagem química: verificação da influência da alimentação na composição química cuticular de indivíduos isolados.

Assim como os experimentos com o cerume, para a verificação da influência da alimentação na composição química cuticular de indivíduos isolados, foram utilizadas duas colônias de *F. varia*. Vinte e oito indivíduos recém emergidos foram coletados de uma das colônias e divididos em dois grupos. Cada grupo foi acondicionado em uma pequena caixa (13x6x8cm). Esses indivíduos foram alimentados com recursos provenientes dos potes de alimento das colônias. Um primeiro grupo recebeu alimento de sua colônia de origem (controle) enquanto o outro recebeu alimento da segunda colônia (teste). Os dois grupos permaneceram durante cerca de dez dias sendo o alimento oferecido *ad libitum*. Após esse período, os indivíduos foram coletados e analisados de acordo com a metodologia descrita no item 2.3. As colônias utilizadas para esse estudo foram as mesmas utilizadas no item 2.6.3, permitindo uma comparação entre os perfis químicos cuticulares encontrados nas duas metodologias aplicadas.

3. Resultados

3.1. Caracterização do perfil cuticular de *Frieseomelitta varia*

A análise dos compostos cuticulares da espécie *Frieseomelitta varia* resultou em um total de 48 compostos identificados. A maior parte das substâncias encontradas é representada por hidrocarbonetos, embora outras classes de compostos como álcoois e ácidos também tenham sido encontradas. Os hidrocarbonetos encontrados estão divididos entre alcanos saturados, insaturados, alcenos, um alcino e alcadienos. Esses compostos apresentam cadeias longas variando de 21 a 31 átomos de carbono. Os alcanos foram os compostos mais abundantes para todos os grupos e, entre os alcanos, o heptacosano foi o mais abundante para a maior parte dos grupos, exceto nas rainhas fisogástricas, nas quais o pentacosano foi superior. A Tabela 1 mostra a média da concentração relativa dos compostos para machos e operárias jovens e velhos e a Tabela 2 mostra esses valores para as rainhas virgens e fisogástricas.

As operárias jovens apresentaram uma diversidade de compostos muito menor quando comparadas às operárias velhas, as ausências estão, principalmente, nos compostos de menor peso molecular. Foram observadas também diferenças nas concentrações dos alcanos, sendo que nas operárias jovens os alcanos com cadeia com 23 e 25 átomos de carbono foram os compostos de maior concentração. Ainda, com relação à comparação entre as operárias, as operárias jovens não apresentaram, ou apresentaram apenas traços, de metade dos compostos com ramificações presentes nas operárias velhas.

Entre os machos de diferentes idades, a maior diversidade de compostos foi encontrada nos indivíduos jovens. Da mesma forma que encontrado nas operárias, os machos jovens também apresentam uma concentração muito superior de tricosano e pentacosano. Ainda, os indivíduos velhos analisados apresentaram uma maior

concentração dos alcanos com cadeias mais longas (heptacosano, nonacosano e hentriacontano) que os indivíduos jovens.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares de machos e operárias de *F. varia* com diferentes idades. Op., operárias; M., machos; DP, desvio padrão

Tempo ret.	Composto	Op. jovens		Op. velhas		M. jovens		M. velhos	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
12,62	Pentadecanol	-		0,57 ± 0,56		0,46 ± 0,27		-	
14,73	Ácido palmítico	-		2,36 ± 2,79		Traços		-	
15,73	Etil ester do ácido palmítico	Traços		2,12 ± 2,86		0,55 ± 0,40		0,20 ± 0,11	
17,44	9 - Octadecen-1ol	Traços		1,71 ± 2,36		0,33 ± 0,24		Traços	
18,17	1 - Octadecenal	-		0,55 ± 0,65		Traços		-	
18,64	Heneicosano (C21)	0,86 ± 0,44		1,10 ± 2,08		3,00 ± 3,06		Traços	
19,38	Ácido linoleico	-		0,54 ± 0,46		Traços		Traços	
20,27	Etil ester do ácido linoleico	-		2,70 ± 2,87		0,15 ± 0,07		Traços	
20,46	Etil ester do ácido oleico	-		5,83 ± 5,83		Traços		Traços	
21,05	N-butilpalmitato	-		Traços		Traços		0,29 ± 0,28	
21,50	Olealdeido	-		2,41 ± 3,57		0,34 ± 0,29		0,67 ± 0,62	
23,22	1 - Eicosino	-		2,17 ± 2,23		Traços		-	
23,35	Z-Tricoseno	0,53 ± 0,40		0,33 ± 0,19		0,50 ± 0,33		Traços	
24,13	Tricosano (C23)	5,40 ± 3,66		2,05 ± 3,09		8,41 ± 7,18		0,35 ± 0,26	
26,77	Tetracosano (C24)	0,57 ± 0,24		0,41 ± 0,54		1,50 ± 1,01		0,08 ± 0,03	
28,45	Z - Pentacoseno	Traços		Traços		-		-	
28,57	Z - Pentacoseno	Traços		0,17 ± 0,06		0,13 ± 0,09		Traços	
28,68	Z - Pentacoseno	Traços		0,11 ± 0,01		0,13 ± 0,05		Traços	
28,75	Z - Pentacoseno	0,26 ± 0,13		Traços		0,22 ± 0,29		Traços	
29,48	Pentacosano (C25)	37,15 ± 9,26		2,51 ± 2,11		24,50 ± 10,46		6,13 ± 3,93	
32,01	Hexacosano (C26)	1,18 ± 0,12		0,54 ± 0,27		2,47 ± 2,86		1,05 ± 0,26	
33,43	Z - Heptacoseno	-		-		-		-	
33,50	Z - Heptacoseno	0,61 ± 0,66		1,65 ± 2,33		0,55 ± 0,29		Traços	
33,78	Z - Heptacoseno	0,61 ± 0,43		0,62 ± 0,95		0,81 ± 0,51		0,36 ± 0,38	
33,94	Z - Heptacoseno	4,70 ± 8,96		Traços		0,53 ± 0,80		0,07 ± 0,03	
34,45	Heptacosano (C27)	34,19 ± 9,44		26,84 ± 15,05		24,83 ± 14,75		49,76 ± 11,36	
35,20	9 e 11 e 13 - Metilheptacosano	0,82 ± 0,58		0,33 ± 0,22		0,93 ± 0,68		Traços	
35,60	5 - Metilheptacosano	Traços		0,30 ± 0,18		0,09 ± 0,04		Traços	
36,16	3 - Metilheptacosano	-		0,97 ± 0,73		0,25 ± 0,22		Traços	
36,80	Octacosano (C28)	0,28 ± 0,15		0,58 ± 0,44		3,87 ± 4,66		0,93 ± 1,85	
37,56	ZZ - Nonacodieno	-		Traços		Traços		0,18 ± 0,07	
37,76	ZZ - Nonacodieno	-		-		0,16 ± 0,13		Traços	
38,27	Z - Nonacoseno	0,38 ± 0,28		-		-		1,26 ± 2,11	
38,40	Z - Nonacoseno	0,57 ± 0,31		0,42 ± 0,45		0,88 ± 0,62		0,31 ± 0,38	
38,60	Z - Nonacoseno	-		0,67 ± 0,16		Traços		Traços	
39,10	Nonacosano (C29)	10,27 ± 2,87		10,05 ± 4,90		5,45 ± 4,71		19,57 ± 6,40	
39,76	11 e 13 e 15 - Metilnonacosano	0,99 ± 0,79		0,77 ± 0,57		0,42 ± 0,21		0,24 ± 0,06	
40,18	3, 11 - Dimetilnonacosano	0,59 ± 0,29		0,85 ± 0,47		0,14 ± 0,11		Traços	
40,72	3 - Metilnonacosano	Traços		2,61 ± 1,69		Traços		Traços	
41,20	Triacotano (C30)	0,60 ± 0,72		0,29 ± 0,17		2,16 ± 2,10		0,15 ± 0,05	
42,05	ZZ - Hentriacontadieno	-		-		-		Traços	
42,23	ZZ - Hentriacontadieno	Traços		Traços		-		Traços	
42,40	ZZ - Hentriacontadieno	-		Traços		-		Traços	
42,55	Z - Hentriaconteno	Traços		-		-		Traços	
42,80	Z - Hentriaconteno	-		-		Traços		Traços	
43,00	Z - Hentriaconteno	-		-		-		Traços	
43,46	Hentriacontano (C31)	2,71 ± 1,22		0,82 ± 0,53		0,80 ± 0,80		2,32 ± 1,45	
44,08	11 e 13 - Metilhentriacontano	1,41 ± 0,99		1,02 ± 1,59		0,45 ± 0,19		0,23 ± 0,23	

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares de rainhas virgens e fisogástricas de *F. varia*. R., rainha; DP, desvio padrão.

Tempo ret.	Composto	R. virgem		R. fisogástrica	
		Média	DP	Média	DP
12,62	Pentadecanol	Traços		Traços	
14,73	Ácido palmítico	Traços		Traços	
15,73	Etil ester do ácido palmítico	0,55 ± 0,05		Traços	
17,44	9 - Octadecen-1ol	0,39 ± 0,20		Traços	
18,17	1 - Octadecenal	-		Traços	
18,64	Heneicosano (C21)	0,71 ± 0,47		Traços	
19,38	Ácido linoleico	-		Traços	
20,27	Etil ester do ácido linoleico	0,52 ± 0,83		-	
20,46	Etil ester do ácido oleico	0,66 ± 0,56		3,49 ± 5,87	
21,05	N-butilpalmitato	3,13 ± 2,10		0,31 ± 0,32	
21,50	Olealdeido	Traços		Traços	
23,22	1 - Eicosino	-		Traços	
23,35	Z-Tricoseno	0,17 ± 0,22		-	
24,13	Tricosano (C23)	0,44 ± 0,31		0,21 ± 0,21	
26,77	Tetracosano (C24)	-		0,12 ± 0,05	
28,45	Z - Pentacoseno	-		0,21 ± 0,13	
28,57	Z - Pentacoseno	Traços		0,30 ± 0,22	
28,68	Z - Pentacoseno	Traços		0,20 ± 0,16	
28,75	Z - Pentacoseno	-		1,65 ± 2,94	
29,48	Pentacosano (C25)	6,81 ± 3,12		11,82 ± 14,70	
32,01	Hexacosano (C26)	0,38 ± 0,12		0,43 ± 0,06	
33,43	Z - Heptacoseno	-		1,14 ± 0,45	
33,50	Z - Heptacoseno	0,18 ± 0,05		1,88 ± 1,01	
33,78	Z - Heptacoseno	0,23 ± 0,14		1,18 ± 0,75	
33,94	Z - Heptacoseno	Traços		1,72 ± 0,22	
34,45	Heptacosano (C27)	16,98 ± 5,64		11,31 ± 2,91	
35,20	9 e 11 e 13 - Metilheptacosano	-		-	
35,60	5 - Metilheptacosano	-		Traços	
36,16	3 - Metilheptacosano	Traços		Traços	
36,80	Octacosano (C28)	0,14 ± 0,05		0,31 ± 0,29	
37,56	ZZ - Nonacodieno	-		0,54 ± 0,44	
37,76	ZZ - Nonacodieno	-		0,65 ± 0,44	
38,27	Z - Nonacoseno	Traços		3,99 ± 2,61	
38,40	Z - Nonacoseno	0,44 ± 0,46		2,84 ± 1,52	
38,60	Z - Nonacoseno	Traços		3,93 ± 0,74	
39,10	Nonacosano (C29)	5,70 ± 1,36		5,63 ± 2,39	
39,76	11 e 13 e 15 - Metilnonacosano	-		Traços	
40,18	3, 11 - Dimetilnonacosano	Traços		0,08 ± 0,07	
40,72	3 - Metilnonacosano	Traços		0,09 ± 0,03	
41,20	triacontano (C30)	Traços		Traços	
42,05	ZZ - Hentriacontadieno	Traços		1,31 ± 0,66	
42,23	ZZ - Hentriacontadieno	-		2,04 ± 0,71	
42,40	ZZ - Hentriacontadieno	-		2,82 ± 0,65	
42,55	Z - Hentriaconteno	-		4,61 ± 1,12	
42,80	Z - Hentriaconteno	Traços		3,44 ± 2,81	
43,00	Z - Hentriaconteno	-		2,00 ± 0,69	
43,46	Hentriacontano (C31)	1,18 ± 0,71		2,03 ± 0,83	
44,08	11 e 13 - Metilhentriacontano	-		-	

Comparando machos e operárias de mesma idade, as operárias jovens apresentam uma menor riqueza de compostos em relação aos machos, enquanto o

contrário é encontrado nos indivíduos velhos, nos quais foi identificada uma maior diversidade de compostos para as operárias. Com relação apenas à presença ou ausência dos compostos, os machos jovens aparentemente possuem um perfil químico mais próximo às operárias adultas.

As rainhas virgens analisadas não apresentaram grande parte dos compostos encontrados nos demais grupos. Outra diferença encontrada nessas rainhas foi uma maior concentração de n-butilpalmitato, composto ausente na maior parte dos grupos e encontrado em pequenas concentrações nos outros.

As rainhas fisogástricas estudadas apresentaram um perfil de compostos cuticulares muito particular. Esses indivíduos apresentaram apenas traços dos compostos de menor peso molecular e apresentam altas concentrações de hidrocarbonetos com ligações duplas. Os alcenos e alcadienos com 27, 29 e 31 átomos de carbono são encontrados em concentrações muito superiores nesse grupo. Além disso, os alcadienos e alcenos com 31 átomos de carbono identificados são encontrados praticamente com exclusividade nessas rainhas, estando presente apenas como traço quando presentes nos demais grupos. Ainda, os alcanos encontrados em concentrações mais altas nos demais grupos (C27 e C29) apresentam uma concentração inferior nessas rainhas.

O Fator 1 da Análise dos Componentes Principais (PCA) descreveu 39.86% da variação encontrada. O Fator 1 + Fator 2 descreveu 61.30% da variância total observada, enquanto a soma dos três primeiros Fatores descreveu 73.10% dessa variância. A análise discriminante *stepwise* dos compostos analisados separou significativamente os grupos analisados (Modelo global: Wilks's $\lambda = 0.0046$, $F_{15,36} = 14.55$, $p < 0.001$). Os compostos responsáveis pela separação entre os grupos de indivíduos foram o pentacosano, hexacosano, heptacosano, z-nonacoseno, e

hentriacontano. A Tabela 3 mostra o resultado da análise canônica para todas as combinações possíveis entre os grupos analisados.

Tabela 3. Resultado da análise discriminante aplicada para os compostos químicos cuticulares de machos e operárias de diferentes idades.

Op., operária; M., macho.

Combinações	Distância de Mahalanobis	$F_{5,13}$	p
Op. jovem vs Op. velha	83,36	32,45	< 0,001
Op. jovem vs M. jovem	33,86	13,18	< 0,001
Op. jovem vs M. velho	35,62	17,60	< 0,001
Op. velha vs M. jovem	78,13	23,90	< 0,001
Op. velha vs M. velho	19,84	7,28	< 0,01
M. jovem vs M. velho	41,85	15,36	< 0,001

A análise canônica mostrou que todos os grupos são significativamente separados entre si (Figura 4). A classificação da matriz apontou um total de 81% de correta alocação dos indivíduos dentro do grupo previsto, enquanto o esperado para uma distribuição ao acaso é de 25%.

3.2. Análise de indivíduos recém emergidos.

3.2.1. Abordagem química: comparação da composição cuticular de indivíduos recém emergidos entre colônias.

A análise dos compostos cuticulares dos indivíduos recém emergidos resultou na identificação de 4 compostos principais (Tabela 4). Todos os compostos são hidrocarbonetos saturados de longa cadeia com número ímpar de carbono começando com o C23 (Tricosano) até o C29 (Nonacosano). Para todas as colônias estudadas, os compostos mais abundantes foram o Pentacosano e o Heptacosano. Pela menor riqueza de substâncias suficientemente representadas em todas as colônias estudadas, a análise dos componentes principais não foi aplicada.

Figura 4. Resultado da análise canônica realizada com os compostos químicos cuticulares dos machos e operárias de diferentes idades.

A análise discriminante *stepwise* dos compostos separou significativamente os grupos de indivíduos recém emergidos de acordo com sua colônia de origem (Modelo global: Wilks's $\lambda = 0.463$, $F_{9,82} = 3.42$, $p < 0.01$). A classificação da matriz resultou numa porcentagem de 72.5% de correta alocação dos indivíduos em seu grupo, enquanto o valor esperado ao acaso era de 25%. Os compostos responsáveis pela segregação entre os grupos foram o pentacosano e o heptacosano.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares dos indivíduos recém emergidos nas quatro colônias de *F. varia* analisadas.

DP., desvio padrão.

Tempo ret.	Composto	Colônia 1		Colônia 2		Colônia 3		Colônia 4	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
23,78	Tricosane	3,37	± 3,50	5,98	± 2,56	5,71	± 4,03	4,20	± 2,06
29,05	Pentacosane	32,80	± 5,02	39,93	± 2,71	40,05	± 14,75	27,34	± 4,14
34,00	Heptacosane	39,00	± 7,42	29,85	± 5,76	27,08	± 8,69	41,38	± 8,58
38,65	Nonacosane	11,85	± 4,83	9,21	± 1,69	10,73	± 6,22	12,36	± 1,66

O Plot da primeira com a segunda raiz da análise discriminante mostrou, ainda, que os indivíduos da colônia 2 não foram completamente segregados dos indivíduos da colônia 3 (colônia 2 vs colônia 3: Mahalanobis distance = 0.17, $F_{3,34} = 0.27$, $p = 0.84$) nem da colônia 1 (colônia 2 vs colônia 1: Mahalanobis distance = 1.71, $F_{3,34} = 2.69$, $p = 0.06$), no entanto, todas as demais combinações foram significativamente separadas (colônia 1 vs colônia 3: Mahalanobis distance = 1.97, $F_{3,34} = 3.11$, $p < 0.05$; colônia 1 vs colônia 4: Mahalanobis distance = 2.62, $F_{3,34} = 4.13$, $p < 0.05$; colônia 2 vs colônia 4: Mahalanobis distance = 3.21, $F_{3,34} = 5.05$, $p < 0.01$; colônia 3 vs colônia 4: Mahalanobis distance = 4.19, $F_{3,34} = 6.59$, $p < 0.01$) (Figura 5).

3.2.2. Abordagem comportamental: verificação da taxa de aceitação de indivíduos recém emergidos.

O resultado dos testes comportamentais da verificação da taxa de aceitação de indivíduos recém emergidos está mostrado na Figura 6. Os indivíduos recém emergidos testados como grupo controle apresentaram uma taxa de rejeição de 10%, enquanto os indivíduos velhos testados no mesmo grupo apresentaram uma taxa de rejeição de 20%. Para o grupo teste, os recém emergidos apresentaram a mesma taxa de 10%, enquanto os indivíduos velhos apresentaram uma taxa de rejeição de 87%. Não houve diferença significativa no grupo controle entre indivíduos velhos e recém emergidos (10% vs 20%: $\chi^2_1 = 1.18$, $p = 0.27$, $n = 60$). Para os indivíduos velhos foi encontrada diferença significativa entre os grupos Teste e Controle (20% vs 87%: $\chi^2_1 = 29.70$, $p < 0.001$, $n = 60$). No grupo teste, a análise estatística acusou diferença significativa entre as taxas de rejeição dos indivíduos recém emergidos e velhos (10% vs 87%: $\chi^2_1 = 38.40$, $p < 0.001$, $n = 60$).

Figura 6. Porcentagem de rejeição de indivíduos adultos e recém emergidos.
*, $p < 0.001$; 0, $p < 0.001$.

3.3. Verificação da aquisição de pistas de reconhecimento a partir dos materiais de construção do ninho.

3.3.1. Abordagem química: verificação de mudança do perfil cuticular após rápido contato com material de ninho estranho.

Na abordagem química da verificação de mudança no perfil cuticular após rápido contato com material de ninho estranho foram encontradas 26 substâncias na cutícula dos indivíduos velhos analisados (Tabela 5). Dentre as substâncias encontradas e identificadas, as mais abundantes foram o heptacosano e o nonacosano. São encontradas algumas mudanças na presença e concentração de alguns compostos entre o grupo controle e o grupo teste.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares dos indivíduos de *F. varia* que permaneceram em contato com material do ninho por dez ou vinte minutos.

DP., desvio padrão.

Tempo ret.	Composto	10 Minutos				20 Minutos			
		Controle		Teste		Controle		Teste	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
15.25	9-Octadecenal	4,54 ± 9,05		1,42 ± 1,30		1,72 ± 1,30		2,98 ± 2,28	
17.00	9-Octadecen-1-ol	Traços		1,15 ± 0,91		2,66 ± 3,48		1,08 ± 1,22	
19.80	Não identificado	1,83 ± 0,58		1,36 ± 0,86		0,64 ± 0,35		0,69 ± 0,46	
20.00	Etil ester do ácido oleico	3,43 ± 3,22		3,40 ± 2,45		Traços		-	
20.37	Não identificado	Traços		Traços		2,71 ± 1,95		4,16 ± 3,45	
20.45	Não identificado	4,20 ± 4,15		6,47 ± 8,02		Traços		Traços	
21.01	Não identificado	2,06 ± 2,67		2,10 ± 1,24		3,01 ± 1,48		3,64 ± 2,82	
21.32	Não identificado	1,14 ± 1,08		1,62 ± 0,53		1,08 ± 0,81		1,11 ± 0,81	
21.55	Não identificado	Traços		1,42 ± 0,61		1,10 ± 0,96		1,10 ± 0,90	
21.65	Não identificado	1,23 ± 1,05		1,63 ± 0,52		1,24 ± 1,15		1,26 ± 1,01	
22.42	Não identificado	0,82 ± 0,49		0,76 ± 0,30		0,82 ± 0,49		1,06 ± 0,54	
22.62	1 - Eicosino	2,81 ± 1,64		3,37 ± 2,62		1,19 ± 0,78		1,05 ± 0,35	
22.73	Não identificado	Traços		0,96 ± 0,92		2,00 ± 1,57		2,78 ± 2,66	
23.55	Não identificado	-		0,69 ± 0,25		1,03 ± 0,79		0,71 ± 0,53	
23.63	Não identificado	Traços		1,62 ± 0,64		3,11 ± 2,87		3,58 ± 3,49	
25.46	Não identificado	1,63 ± 1,22		3,27 ± 2,28		-		Traços	
26.01	Não identificado	1,99 ± 1,61		2,25 ± 1,24		2,44 ± 2,74		2,78 ± 1,52	
28.92	Pentacosano	4,85 ± 6,76		2,11 ± 1,48		5,70 ± 6,52		4,94 ± 3,10	
29.49	Contaminação	0,71 ± 0,44		0,30 ± 0,23		1,14 ± 0,95		0,98 ± 0,52	
33.91	Heptacosano	47,81 ± 19,62		31,49 ± 9,91		46,99 ± 11,99		50,08 ± 14,60	
38.52	Nonacosano	13,74 ± 5,58		8,90 ± 2,10		15,82 ± 5,20		14,61 ± 4,28	
42.84	Não identificado	0,38 ± 0,13		Traços		0,60 ± 0,29		0,48 ± 0,19	
44.60	Não identificado	6,03 ± 5,27		6,90 ± 5,11		-		-	
48.52	Não identificado	Traços		2,55 ± 2,07		Traços		Traços	
49.54	Não identificado	Traços		1,79 ± 2,24		-		-	

Na análise realizada para os indivíduos que permaneceram em contato com o cerume durante dez minutos, a soma dos três primeiros fatores da análise dos componentes principais aplicada para todos os 26 picos explica 92,91% da variância total encontrada. A análise discriminante *stepwise* mostrou que o grupo controle não é significativamente separado do grupo teste (Modelo global: Wilks's $\lambda = 0.26$, $F_{1,10} = 2.77$, $p = 0.14$). A classificação da matriz mostrou uma porcentagem de 76.4% de correta alocação dos indivíduos em seu grupo experimental, enquanto o valor esperado ao acaso era de 50%.

Na comparação entre os indivíduos que permaneceram em contato por 20 minutos, as somas dos três primeiros fatores da análise dos componentes principais explicam 91,48% de toda a variação encontrada. A análise discriminante acusou uma separação significativa entre os grupos controle e teste (Modelo global: Wilks's $\lambda = 0.447$, $F_{1,10} = 12.33$, $p < 0.01$). O composto responsável por essa separação foi o composto não identificado que eluiu no tempo 42.84. A classificação da matriz resultou em 73.68% de correta alocação dos indivíduos no seu grupo previsto, enquanto que o esperado ao acaso para dois grupos analisados é de 50%.

3.3.2. Abordagem comportamental: verificação de alterações no padrão de reconhecimento após rápido contato com material de ninho estranho.

A Figura 7 mostra a porcentagem de rejeição dos indivíduos que permaneceram em contato com material da própria colônia (controle) ou de uma colônia estranha (teste) durante dez e vinte minutos. Para o grupo de dez minutos, os indivíduos controle apresentaram uma taxa de rejeição de 18% enquanto os indivíduos testes apresentaram uma taxa de 33%. Não houve diferença estatística entre as taxas de rejeição desses indivíduos (18% vs 33%: $\chi^2_1 = 3.52$, $p = 0.06$, $n = 120$). Dentre os indivíduos que

ficaram em contato com o cerume durante vinte minutos, aqueles que permaneceram com material da própria colônia apresentaram uma taxa de rejeição de 27%, enquanto os que ficaram em contato com material de uma colônia estranha apresentaram uma taxa de rejeição de 72%. A análise estatística acusou diferenças significativas entre a taxa de rejeição desses grupos (27% vs 72%: $\chi^2_1 = 24.31$, $p < 0.001$, $n = 120$). Não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos controles (18% vs 27%: $\chi^2_1 = 1.19$, $p = 0.27$, $n = 120$). No entanto, a análise estatística mostrou que existe uma diferença significativa entre as taxas de rejeição dos grupos testes (33% vs 72%: $\chi^2_1 = 17.68$, $p < 0.001$, $n = 120$).

Figura 7. Porcentagem de rejeição para os indivíduos que ficaram em contato com o cerume por dez ou vinte minutos.
*, $p < 0.001$; °, $p < 0.001$.

3.3.3. Abordagem química: verificação de mudança do perfil cuticular após longo contato, isolado da colônia, com material de ninho estranho.

Nos testes de verificação de mudança do perfil cuticular após longo contato com material de ninho estranho, com indivíduos isolados da colônia, foram encontradas 19 substâncias principais. Os compostos encontrados foram alcanos lineares, alcenos, um álcool e um éster além de alguns compostos que não puderam ser identificados. Os compostos com maiores concentrações foram os alcanos lineares de cadeias longas

(C25, C27 e C29). O tempo de retenção de cada composto e suas concentrações estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares dos testes de verificação de mudança do perfil cuticular após longo contato, isolado da colônia, com material de ninho estranho.

DP., desvio padrão.

Tempo ret.	Composto	Teste		Controle	
		Média	DP	Média	DP
12,50	Z-Nonadeceno	1,07 ± 0,65		0,87 ± 0,28	
15,00	<i>Não identificado</i>	1,43 ± 1,24		1,09 ± 1,00	
15,25	<i>Não identificado</i>	1,15 ± 2,08		0,31 ± 0,13	
15,50	9-Octadecenal	2,56 ± 2,46		2,38 ± 2,95	
17,25	9-Octadecene1-ol	3,65 ± 2,81		2,17 ± 1,71	
20,25	<i>Não identificado</i>	0,53 ± 0,50		0,47 ± 0,30	
20,60	<i>Não identificado</i>	1,24 ± 1,41		0,76 ± 0,59	
28,50	Z-Pentacosene	0,67 ± 1,08		0,12 ± 0,06	
29,25	Pentacosano	11,44 ± 3,34		16,12 ± 5,79	
30,50	<i>Não identificado</i>	0,85 ± 0,57		0,58 ± 0,31	
31,75	Hexacosano	0,95 ± 0,16		1,15 ± 0,42	
33,50	Z-Heptacoseno	0,62 ± 1,23		0,30 ± 0,28	
34,25	Heptacosano	51,91 ± 10,41		48,85 ± 7,87	
36,50	<i>Não identificado</i>	0,49 ± 0,10		0,60 ± 0,27	
36,75	<i>Não identificado</i>	0,16 ± 0,09		0,32 ± 0,38	
38,80	Nonacosano	11,87 ± 2,23		14,33 ± 7,30	
43,25	<i>Não identificado</i>	0,50 ± 0,13		0,65 ± 0,22	
45,75	<i>Não identificado</i>	0,99 ± 0,87		0,76 ± 1,19	
52,10	<i>Não identificado</i>	1,34 ± 1,10		0,59 ± 0,66	

A soma dos três primeiro fatores da análise dos componentes principais (PCA) explica 79.52% de toda a variância encontrada. A análise discriminante dos compostos principais separou significativamente os tratamentos (Modelo global: Wilks's $\lambda = 0.271$; $F_{4,9} = 6.03$; $p < 0.05$). A substância responsável pela separação entre os grupos foi aquela não identificada cujo tempo de retenção é 36.75. A função demonstrou 76.92% de alocação correta dos indivíduos nos grupos em que foram previstos.

3.4. Verificação da aquisição de pistas de reconhecimento a partir da alimentação.

3.4.1. Abordagem comportamental: verificação de alterações no sistema de reconhecimento através da convergência alimentar.

Na verificação de alterações no padrão de reconhecimento através da convergência alimentar, os testes comportamentais acusaram uma média inicial de rejeições de $94.44 \pm 13.36\%$ para indivíduos não companheiros de ninho e $14.81 \pm 6.83\%$ para os companheiros de ninho (Figura 8). Nos testes seguintes, as porcentagens de rejeições, tanto para companheiros de ninho como para não companheiros de ninho, não apresentaram grandes variações (primeira semana: controle $16.67 \pm 6.25\%$ vs. teste $96.30 \pm 18.47\%$; segunda semana: controle $14.81 \pm 4.68\%$ vs. teste $98.15 \pm 1.85\%$; terceira semana: controle $16.83 \pm 4.60\%$ vs. teste 100% ; quarta semana: controle $7.41 \pm 5.49\%$ vs. teste $98.15 \pm 1.85\%$).

Figura 8. Gráfico das médias e erro padrão das porcentagens de reconhecimento de companheiros de ninho (controle) e não companheiros de ninho (teste), que receberam a mesma alimentação e testadas durante quatro semanas consecutivas.

3.4.2. Abordagem química: verificação dos efeitos da convergência alimentar no perfil dos compostos cuticulares.

Na verificação dos efeitos da convergência alimentar no perfil dos compostos cuticulares, foram encontradas trinta substâncias principais. Dentre as substâncias identificadas, foram encontrados alcanos, alcenos, alcadienos e alcanos ramificados, além de um aldeído e um álcool (Tabela 7). Assim como nas demais análises químicas, os compostos mais abundantes foram os alcanos com 27 e 29 átomos de carbono. São encontradas diferenças tanto na concentração dos compostos quanto na presença ou ausência dos mesmos entre os grupos teste e controle, para todas as sessões analisadas. A análise discriminante acusou que, para todas as sessões, os grupos teste e controle se separaram significativamente. Os valores da análise discriminante estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Modelo global da análise discriminante aplicada à concentração relativa dos compostos cuticulares de indivíduos de *F. varia* que receberam a mesma dieta durante quatro semanas.

	<u>Wilks' Lambda</u>	<u>F</u>	<u>GI</u>	<u>p</u>
Antes	0.00472	90.329	7,3	< 0.01
1ª Semana	0.16573	12.584	4,10	< 0.001
2ª Semana	0.01471	223.29	3,10	< 0.001
3ª Semana	0.01336	196.89	3,8	< 0.001
4ª Semana	0.00071	702.77	6,3	< 0.001

A soma dos três primeiros fatores da análise dos componentes principais acusou as seguintes porcentagens de total explicação de toda a variância encontrada para as substâncias analisadas: antes 84.21%, primeira semana 76.82%, segunda semana 78.54%, terceira semana 81.55% e quarta semana 80.49%. As substâncias que apresentaram significância estatística na separação dos grupos foram diferentes para cada sessão realizada. Para os testes realizados antes da remoção do alimento colonial e introdução da dieta artificial, os compostos responsáveis pela separação das colônias foram o eicosadieno, metilheptacosano, e os compostos, não identificados, com o tempo de retenção 46.29, 46.96 e 48.21. Para os testes realizados uma semana após a

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares dos indivíduos de *F. varia* que receberam a mesma dieta durante quatro semanas.

DP., desvio padrão.

Tempo ret.	Composto	Antes		1ª Semana				2ª Semana				3ª Semana				4ª Semana			
		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
15,25	9 - Octadecenal	2,41 ± 3,86		3,42 ± 1,44		1,17 ± 0,99		1,54 ± 1,36		0,55 ± 0,25		1,89 ± 2,15		1,27 ± 2,10		5,19 ± 5,53		1,13 ± 1,38	
17,70	N - Octadecanol	1,13 ± 0,53		Traços		0,64 ± 0,99		3,51 ± 1,56		0,31 ± 0,04		2,20 ± 1,02		0,19 ± 0,08		1,30 ± 0,76		0,25 ± 0,10	
21,04	Z - Heneicoseno	1,67 ± 0,57		Traços		0,61 ± 0,24		1,08 ± 0,90		0,71 ± 0,55		1,64 ± 1,15		0,97 ± 0,68		1,44 ± 2,63		1,52 ± 1,77	
21,57	Não identificado	0,77 ± 0,61		Traços		0,72 ± 1,23		0,26 ± 0,17		0,18 ± 0,05		0,54 ± 0,67		0,18 ± 0,09		0,23 ± 0,20		0,14 ± 0,08	
22,29	Não identificado	0,93 ± 0,72		Traços		0,07 ± 0,05		0,17 ± 0,09		0,06 ± 0,02		0,14 ± 0,05		0,11 ± 0,02		0,17 ± 0,09		0,12 ± 0,05	
22,54	ZZ - Eicosadieno	1,72 ± 0,85		0,47 ± 0,49		3,85 ± 1,46		3,28 ± 2,19		9,76 ± 2,03		3,12 ± 1,32		5,03 ± 2,64		2,05 ± 1,09		3,75 ± 2,21	
22,70	ZZ - Eicosadieno	2,42 ± 5,47		4,78 ± 3,64		1,60 ± 1,48		2,42 ± 3,72		Traços		1,40 ± 1,54		1,59 ± 1,67		1,80 ± 2,38		0,61 ± 0,38	
23,62	Não identificado	1,05 ± 0,43		0,17 ± 0,12		1,29 ± 1,17		0,49 ± 0,22		1,71 ± 0,61		0,46 ± 0,19		1,42 ± 0,67		0,34 ± 0,16		0,93 ± 0,52	
23,95	Não identificado	1,38 ± 0,87		-		0,25 ± 0,08		0,40 ± 0,21		0,25 ± 0,08		0,47 ± 0,41		0,47 ± 0,08		0,38 ± 0,26		0,58 ± 0,22	
25,38	Não identificado	Traços		-		0,21 ± 0,19		0,19 ± 0,13		0,63 ± 0,34		0,21 ± 0,10		0,33 ± 0,17		0,47 ± 0,24		1,24 ± 0,82	
27,17	Não identificado	1,18 ± 0,71		-		Traços		0,17 ± 0,12		Traços		Traços		-		Traços		Traços	
28,90	Pentacosano	2,78 ± 1,50		1,99 ± 0,56		2,00 ± 1,25		4,72 ± 3,32		3,50 ± 2,90		4,93 ± 4,56		1,70 ± 0,54		4,45 ± 4,24		2,21 ± 1,27	
29,50	Contaminação	12,54 ± 11,69		3,26 ± 3,97		6,72 ± 4,68		5,85 ± 2,31		3,68 ± 0,95		5,70 ± 2,87		5,00 ± 1,98		6,91 ± 3,65		4,35 ± 1,75	
31,41	Não identificado	0,35 ± 0,10		0,53 ± 0,11		0,54 ± 0,20		0,68 ± 0,33		0,97 ± 0,35		0,76 ± 0,24		0,71 ± 0,09		0,74 ± 0,19		0,71 ± 0,18	
33,08	Z - Heptacoseno	0,50 ± 0,29		0,10 ± 0,05		1,03 ± 0,40		2,27 ± 1,19		2,26 ± 0,51		1,56 ± 0,97		0,43 ± 0,16		Traços		-	
33,87	Heptacosano	25,88 ± 12,28		42,43 ± 12,13		38,44 ± 10,08		38,66 ± 9,53		41,54 ± 5,31		44,05 ± 10,93		47,52 ± 5,20		46,18 ± 10,86		45,46 ± 10,78	
35,60	3 - Metilheptacosano	0,87 ± 0,34		0,87 ± 0,45		0,42 ± 0,55		0,83 ± 0,33		0,11 ± 0,15		0,55 ± 0,62		0,17 ± 0,14		0,22 ± 0,12		0,71 ± 0,85	
36,21	N - Metilheptacosano	0,74 ± 0,26		0,90 ± 0,16		0,66 ± 0,18		0,50 ± 0,15		0,63 ± 0,06		0,51 ± 0,11		0,61 ± 0,06		0,57 ± 0,17		0,76 ± 0,26	
36,32	N - Metilheptacosano	0,77 ± 0,14		0,94 ± 0,26		0,64 ± 0,25		0,81 ± 0,57		0,49 ± 0,24		0,83 ± 0,27		0,54 ± 0,17		0,95 ± 0,23		1,00 ± 1,13	
38,50	Nonacosano	16,73 ± 7,95		26,71 ± 5,14		16,79 ± 4,73		11,22 ± 4,90		11,57 ± 1,98		12,44 ± 3,23		12,66 ± 1,90		12,79 ± 4,84		14,76 ± 5,74	
39,34	Não identificado	1,26 ± 1,26		-		0,16 ± 0,09		Traços		0,11 ± 0,04		Traços		0,14 ± 0,04		Traços		0,14 ± 0,07	
39,60	N - Metilnonacosano	1,35 ± 0,88		Traços		0,44 ± 0,53		0,58 ± 0,23		0,08 ± 0,05		0,34 ± 0,36		0,17 ± 0,15		0,50 ± 0,51		0,62 ± 1,14	
40,11	N - Metilnonacosano	2,72 ± 2,92		1,30 ± 1,14		0,44 ± 0,62		-		0,12 ± 0,07		0,54 ± 0,59		0,15 ± 0,14		0,24 ± 0,09		1,47 ± 2,45	
42,84	Hentriacontano	1,21 ± 0,42		2,51 ± 1,44		0,81 ± 0,49		0,68 ± 0,25		0,32 ± 0,10		0,65 ± 0,34		0,28 ± 0,14		0,38 ± 0,09		0,64 ± 0,65	
43,38	Não identificado	0,93 ± 0,69		Traços		-		0,12 ± 0,06		Traços		-		-		Traços		-	
45,26	Não identificado	0,82 ± 0,30		0,36 ± 0,35		1,01 ± 0,30		1,23 ± 0,93		0,70 ± 0,20		1,31 ± 0,88		0,67 ± 0,25		0,74 ± 0,45		1,13 ± 0,25	
46,29	Não identificado	1,11 ± 0,50		0,53 ± 0,44		1,26 ± 0,35		1,56 ± 1,11		0,88 ± 0,26		1,36 ± 1,03		0,75 ± 0,31		0,76 ± 0,48		1,30 ± 0,32	
46,96	Não identificado	1,01 ± 0,46		0,40 ± 0,37		1,19 ± 0,45		1,41 ± 0,82		0,93 ± 0,30		1,25 ± 0,90		0,82 ± 0,29		0,74 ± 0,34		1,47 ± 0,36	
48,21	Não identificado	1,15 ± 0,95		0,74 ± 0,67		1,55 ± 0,45		1,93 ± 1,26		1,21 ± 0,40		1,57 ± 0,99		0,94 ± 0,35		0,82 ± 0,45		1,62 ± 0,40	
48,54	Não identificado	1,70 ± 1,42		1,75 ± 1,61		2,53 ± 1,35		2,13 ± 1,78		2,03 ± 0,80		3,15 ± 2,09		0,99 ± 0,35		0,79 ± 0,45		1,22 ± 0,42	

introdução da dieta artificial, os compostos responsáveis pela separação entre os ninhos foram o metilheptacosano e o composto, não identificado, com o tempo de retenção 23,62. Após duas semanas de dieta artificial, os compostos responsáveis pela separação entre as colônias testadas foram o eicosadieno e o composto não identificado eluído no tempo 23,62. Na terceira semana de teste após a introdução da dieta artificial, os compostos apresentados como os responsáveis pela separação das colônias foram o octadecanol e o eicosadieno. Para a última sessão de testes, quarta semana, os compostos apontados como responsáveis pela separação entre os grupos foram o octadecanol, o pentacosano, e os compostos não identificados, que eluíram com o tempo 22,29, 46,96 e 48,21. A classificação da matriz resultou em uma correta alocação de 100% dos indivíduos em seu grupo previsto para aqueles analisados antes da troca do alimento, na terceira e na quarta semana após essa troca. Para a primeira semana, a porcentagem foi de 94,11% e na segunda semana foi de 93,75 de correta alocação dos indivíduos no grupo previsto, sendo que o esperado em uma distribuição ao acaso para dois grupos (controle e teste) é de 50%.

3.4.3. Abordagem química: verificação da influência da alimentação na composição química cuticular de indivíduos isolados.

Na abordagem química da verificação da influência da alimentação na composição química cuticular de indivíduos isolados, os compostos encontrados foram os mesmos descritos para os experimentos com a influência dos materiais do ninho, com exceção do composto com o tempo de retenção 36,75. Os principais compostos encontrados foram hidrocarbonetos simples lineares, insaturados, um álcool, um éster, além de alguns compostos ainda não identificados. Os compostos mais abundantes foram hidrocarbonetos lineares de cadeias longas (C25, C27 e C29). O tempo de

retenção das substâncias encontradas, bem como sua concentração média nos grupos amostrados estão descritos na Tabela 9. A soma dos três primeiros fatores da análise dos componentes principais explica um total de 74.08%. A análise discriminante dos compostos separou significativamente os grupos experimentais (Modelo global: Wilks's $\lambda = 0.514$; $F_{(2,18)} = 8.50$; $p < 0.01$). O composto responsável pela separação entre os grupos analisados foi o z-pentacoseno. A análise mostrou também que 79.16% dos indivíduos estão corretamente alocados em seus grupos previstos.

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão da concentração relativa dos compostos cuticulares dos testes de verificação da influência da alimentação na composição química cuticular de indivíduos isolados de *F. varia*.

DP., desvio padrão.

Tempo ret.	Composto	Teste		Controle	
		Média	DP	Média	DP
12,40	Z-Nonadeceno	0,62 ± 0,23		0,87 ± 0,60	
15,00	<i>Não identificado</i>	3,53 ± 2,71		2,44 ± 2,10	
15,25	<i>Não identificado</i>	0,76 ± 0,38		0,64 ± 0,38	
15,50	9-Octadecenal	1,13 ± 0,95		0,67 ± 0,24	
17,25	9-Octadecene1-ol	4,68 ± 2,36		3,60 ± 2,28	
20,15	<i>Não identificado</i>	0,51 ± 0,28		0,45 ± 0,32	
20,60	<i>Não identificado</i>	4,61 ± 3,32		3,49 ± 2,74	
28,55	Z-Pentacosene	0,10 ± 0,06		0,08 ± 0,05	
29,20	Pentacosano	11,42 ± 5,12		8,19 ± 2,86	
30,50	<i>Não identificado</i>	1,10 ± 0,51		0,65 ± 0,38	
31,70	Hexacosano	1,04 ± 0,16		0,88 ± 0,15	
33,50	Z-Heptacoseno	0,27 ± 0,14		0,22 ± 0,15	
34,20	Heptacosano	45,51 ± 6,97		44,40 ± 9,67	
36,50	<i>Não identificado</i>	0,50 ± 0,09		0,47 ± 0,10	
38,80	Nonacosano	12,18 ± 2,35		12,03 ± 2,93	
43,15	<i>Não identificado</i>	0,57 ± 0,16		0,53 ± 0,20	
45,75	<i>Não identificado</i>	0,41 ± 0,36		1,01 ± 0,88	
52,00	<i>Não identificado</i>	2,26 ± 1,38		5,55 ± 2,70	

4. Discussão

O resultado da análise dos compostos químicos cuticulares da espécie *Frieseomelitta varia* mostrou claras diferenças entre operárias e machos e, dentro desses grupos, diferenças com relação à idade. Embora as rainhas não tenham participado da análise estatística em decorrência do pequeno número amostral, essas apresentaram perfis cuticulares específicos, representados pela maior concentração de *n* – butilpalmitato nas rainhas virgens e exclusividade de alcenos e alcadienos de longa cadeia nas rainhas fisogástricas. Esses resultados estão de acordo com a grande quantidade de estudos com compostos cuticulares de insetos sociais encontrados na literatura, os quais apontam essas substâncias como assinaturas químicas individuais que carregam informações a respeito da casta, idade, sexo e status reprodutivo dos indivíduos (revisado por Howard e Blomquist, 2005).

A maior parte dos compostos encontrados na análise do perfil cuticular de operárias de *F. varia* também foram descritos para as outras espécies de abelhas sem ferrão já analisadas e presentes na literatura (*Melipona bicolor*: Abdalla *et al.*, 2003; *Melipona scutellaris* e *Melipona rufiventris*: Pianaro *et al.*, 2007; *Scaptotrigona bipunctata*: Jungnickel *et al.*, 2004; *Frieseomelitta varia* e *Lestrimelitta limao*: Nunes *et al.*, 2008; *Schwarziana quadripunctata*: Nunes *et al.*, submetido). Para todas essas espécies, os compostos foram principalmente hidrocarbonetos de cadeias variando de 19 a 33 átomos de carbono. As maiores concentrações são encontradas para os compostos de cadeias ímpares. Com exceção de *Melipona bicolor*, estudada por Abdalla *et al.* (2003), todas as demais espécies analisadas apresentaram maiores concentrações de alcanos, principalmente aqueles com cadeias com 27 e 29 átomos de carbono. Em *Melipona bicolor*, para a maior parte dos grupos estudados, os alcenos apresentaram as concentrações mais elevadas. Assim como no presente estudo, Abdalla *et al.* (2003)

também observaram diferenças qualitativas e quantitativas entre os gêneros e as idades das abelhas sem ferrão *M. bicolor*. No entanto, não verificaram diferenças entre operárias jovens e rainhas virgens, o que foi demonstrado nesse estudo para a espécie *F. varia*. Para *Schwarziana quadripunctata* também foram descritas diferenças entre operárias jovens, velhas e rainhas virgens. No entanto, o estudo não caracterizou o perfil cuticular de machos e rainhas fisogástricas para essa espécie (Nunes *et al.*, *submetido*).

Com exceção das rainhas virgens, os indivíduos jovens apresentam uma maior concentração de alcanos com as cadeias mais curtas, como o tricosano e o pentacosano, quando comparados aos indivíduos mais velhos. Tais compostos podem estar relacionados a uma indicação da idade desses indivíduos.

Operárias jovens apresentaram uma composição cuticular menos rica em diversidade de compostos em relação aos indivíduos adultos (Figura 9). Similarmente aos resultados encontrados em *Frieseomelitta varia*, em abelhas melíferas, a diversidade, bem como a concentração, dos hidrocarbonetos cuticulares é menor em indivíduos jovens do que em indivíduos adultos (Breed *et al.*, 2004). Tais diferenças podem estar relacionadas ao tempo de contato do indivíduo com fontes odoríferas externas (Breed *et al.*, 1995; Downs e Ratnieks, 1999; Breed *et al.*, 2004) ou com processos relacionados à esclerotização da cutícula (Thompson, 1978; Thompson e Hepburn, 1978; Andersen *et al.*, 1981), ou ainda uma soma desses fatores.

Podem ser encontrados na literatura estudos mostrando diferenças qualitativas nos compostos cuticulares, em diversas espécies de insetos sociais e solitários, de indivíduos de diferentes sexos (Nelson e Carlson, 1986; Nelson *et al.*, 1988; Sutton e Carlson, 1997; Ginzel *et al.*, 2003). Em outros casos, são encontradas diferenças em suas concentrações relativas (Jackson e Bartelt, 1986; Jallon e David, 1987; Toolson e Kuper-Simbrom, 1989; Howard, 1992; Cobb e Ferveur, 1996; Howard, 1998, Bartelt *et*

Figura 9. Cromatograma mostrando as diferenças entre as substâncias encontradas na cutícula de um indivíduo recém emergido e um indivíduo adulto.

al., 1996; Howard *et al.*, 2001). Alguns estudos, no entanto, mostram que ambos os sexos possuem os mesmos compostos e aparentemente com as mesmas concentrações relativas (Howard, 1992; Howard e Liang, 1993; Howard e Pérez-Lachaud, 2002; Howard, *et al.*, 2003; Howard e Baker 2003). Nossos dados mostraram tanto diferenças qualitativas quanto quantitativas nas concentrações dos compostos cuticulares para os dois sexos. No entanto, assim como a maior parte dos estudos realizados que apontaram tais diferenças, faltam estudos mostrando a direta relação entre esses perfis cuticulares e a discriminação do sexo pelos indivíduos da colônia. Alguns poucos estudos podem ser encontrados mostrando que essas substâncias são usadas pelos insetos no reconhecimento de gênero (Carlson *et al.*, 1964; Howard, 1998; Ginzel *et al.*, 2003).

Diferentemente das operárias, nos machos, os indivíduos jovens apresentaram uma maior riqueza de compostos. A ausência dos compostos nos machos adultos pode ser resultado do fato desses indivíduos não habitarem a colônia enquanto velhos. Dessa forma, a ausência desse contato poderia resultar em uma menor riqueza de substâncias cuticulares, conforme demonstrado por Breed *et al.* (1995); Downs e Ratnieks (1999) e Breed *et al.* (2004) em abelhas melíferas.

As rainhas virgens das abelhas sem ferrão não pertencentes ao gênero *Melipona* apresentam comportamentos diversificados logo após a emergência (Imperatriz-Fonseca e Zucchi, 1995; Silva et al., 1972). Essas rainhas, em certos casos, se movimentam rapidamente no interior da colônia e são intensamente acessadas pelas operárias. A rainha recém emergida pode ter três destinos diferentes: (a) substituir a rainha fisogástrica, (b) ser eliminada pelas operárias ou (c) enxamear (Sakagami, 1982). O modo como as operárias distinguem uma rainha virgem de outras operárias logo após a emergência ainda é desconhecido. Assim como sua morfologia e comportamento característicos podem ser sinais para a distinção pelas operárias, também os compostos químicos associados a sua cutícula podem indicar sua casta. Dessa forma, as operárias podem identificar esse indivíduo como uma rainha pela presença, ausência ou diferenças nas concentrações dos compostos comuns. Ainda, as rainhas virgens podem ser identificadas pela presença em concentrações relativamente altas do composto *n* – butilpalmitato, composto esse ausente na maior parte dos outros grupos e, quando presente, encontrado em baixas concentrações.

As rainhas fisogástricas apresentam um perfil cuticular muito característico, com uma grande quantidade de alcenos e alcadienos (Figura 10). A análise dos cromatogramas desses indivíduos mostra que à medida que a molécula aumenta em número de carbonos, os alcanos são encontrados em menores concentrações e os alcenos e os alcadienos aparecem em maiores concentrações. Dentro das questões relacionadas ao desenvolvimento ovariano das operárias dos himenópteros sociais, um problema a longo tempo levantado é o meio através do qual as rainhas mantêm seu status reprodutivo e reconhecem o status dos demais indivíduos. Embora nas abelhas melíferas tenham sido identificados feromônios provenientes da glândula mandibular exercendo as funções acima citadas, muitos estudos recentes indicam que os

hidrocarbonetos cuticulares atuam como pistas primárias de fertilidade em alguns insetos sociais (Monnin *et al.*, 1998; Peeters *et al.*, 1999; revisado por Howard e Blomquist, 2005). Endler *et al.* (2004) mostraram que em colônias de formigas da espécie *Camponotus floridanus*, a rainha “marca” seus ovos com hidrocarbonetos cuticulares e esses compostos atuam como indicadores da presença da rainha resultando

Figura 10. Cromatograma mostrando as diferenças entre as substâncias encontradas na cutícula de uma operária velha e uma rainha fisogástrica.

na não oviposição de operárias. De modo semelhante, os compostos identificados para as rainhas fisogástricas de *F. varia* podem atuar como sinalizadores da presença da rainha, desencadeando toda a gama de comportamento apresentada pelas operárias com a rainha, tais como corte, alimentação e aqueles relacionados ao processo de provisionamento e postura (POP).

Nossos dados mostraram, em indivíduos recém emergidos e jovens de *Frieseomelitta varia*, ausência de muitos compostos presentes nos adultos, principalmente alcenos e alcanos ramificados. O resultado geral das análises estatísticas, para os indivíduos recém emergidos, acusou que os compostos cuticulares testados separaram significativamente as quatro colônias. Porém, na comparação aos pares, duas dentre as seis combinações possíveis não foram significativamente separadas. Esses

resultados mostram que, na maior parte dos casos, os indivíduos de uma colônia, mesmo que recém emergidos, já possuem um perfil cuticular característico. Os testes comportamentais mostraram que, apesar das diferenças químicas, as guardas não são capazes de discriminar entre companheiros e não companheiros de ninhos quando trata-se indivíduos recém emergidos. Esses dados sugerem que apesar de terem sido encontrados compostos químicos associados à cutícula desses indivíduos, esses compostos não são utilizados como sinais nos sistemas de reconhecimento. Similarmente, abelhas melíferas (*Apis mellifera*) recém emergidas apresentam uma menor riqueza e concentração dos compostos associados à cutícula e, quando introduzidas em colônias estranhas, não sofrem rejeição (Breed *et al.*, 2004). Segundo Breed *et al.*, (2004), tal fato ocorre devido à ausência de sinais de reconhecimento nessas abelhas. Baseado no exposto anteriormente é possível deduzir que as pistas associadas ao reconhecimento provavelmente são aquelas que não estão presentes nos indivíduos recém emergidos, ou seja, alcanos ramificados, alcenos e alcadienos. Bioensaios com substâncias isoladas poderão elucidar quais os compostos específicos utilizados nesse sistema de reconhecimento. Os indivíduos recém emergidos provavelmente não apresentam tais pistas, pois, pelo fato de apresentarem a cutícula pouco esclerotizada, não são capazes de voar e deixar a colônia, não necessitando, desse modo, de pistas de reconhecimento.

Estudos de reconhecimento realizados com substâncias isoladas aplicadas na abelha sem ferrão *Trigona fulviventrís* acusou que os indivíduos dessa espécie utilizam o pentacosano como pista para o reconhecimento (Buchwald e Breed, 2005). Apesar de essa substância ter sido identificada nos indivíduos recém emergidos de *F. varia*, conforme citado anteriormente, esses indivíduos não foram rejeitados quando inseridos em uma segunda colônia. Esses resultados mostram que espécies diferentes de abelhas

sem ferrão podem utilizar diferentes pistas nos sistemas de reconhecimento. Uma segunda possibilidade é a de ter ocorrido imprecisões nos testes com o pentacosano em *Trigona fulviventrís*, visto que a concentração utilizada pelos autores nos testes é muito superior àquela encontrada naturalmente nos indivíduos.

Os resultados dos experimentos de reconhecimento e das análises químicas realizados com os indivíduos que permaneceram em contato com cerume do próprio ninho ou de um segundo ninho mostram claramente que ocorre uma transferência de pistas utilizadas no reconhecimento através de um breve contato com o cerume. As análises químicas para os indivíduos que permaneceram por dez minutos em contato com o cerume mostraram que esse tempo já foi suficiente para que a concentração de alguns compostos mudasse, ou mesmo para a aquisição de um novo composto. Como mostra a Tabela 2, o composto com Tempo de Retenção 23.55 minutos é ausente no grupo controle do primeiro par de colônias, mas está presente no grupo teste desse mesmo par. Os resultados estatísticos, no entanto, não apontaram diferenças significativas tanto químicas quanto comportamentais, para os testes realizados com dez minutos de contato dos indivíduos com o cerume. Entretanto, após vinte minutos de contato, foram observadas diferenças estatísticas na porcentagem de rejeição entre os grupos controle e teste nas análises comportamentais. Além disso, foi observado um aumento significativo entre a taxa de rejeição dos indivíduos do grupo teste que permaneceram em contato com o cerume por dez minutos e aqueles do mesmo grupo que permaneceram em contato por vinte minutos. As análises estatísticas aplicadas aos compostos cuticulares dos indivíduos testados mostraram que vinte minutos de contato com cerume de outro ninho foram suficientes para a completa separação entre os grupos. Os indivíduos recém emergidos discutidos anteriormente foram coletados para análise muito provavelmente depois de mais de vinte minutos de suas emergências. O

fato desses indivíduos não apresentarem sinais de reconhecimento mesmo após esse tempo de contato pode estar relacionado com características específicas de suas cutículas (Andersen *et al.*, 1981; Thompson e Hepburn 1978).

Em abelhas sem ferrão nada é conhecido a respeito da influência dos materiais do ninho no reconhecimento de companheiros e não companheiros de ninho. No entanto, nas abelhas melíferas, uma série de relatos pode ser encontrada a esse respeito. Os resultados encontrados em *F. varia* concordam com os estudos encontrados na literatura com abelhas melíferas (Breed *et al.*, 1995; Downs e Ratnieks, 1999; Breed *et al.*, 2004; D'Ettorre *et al.*, 2006). Nessas abelhas, testes comportamentais relatam a transferência de sinais utilizados no reconhecimento através da cera após um contato de apenas cinco minutos (Breed *et al.*, 1995). Ainda com relação às abelhas melíferas, segundo D'Ettorre *et al* (2006), a troca de material do ninho entre duas colônias produziu uma diminuição da taxa de rejeição devido a um aumento na similaridade entre os perfis químicos dessas colônias.

Assim como a cera nas abelhas melíferas (Breed *et al.*, 1995), em *F. varia* o cerume poderia atuar como um unificador dos compostos químicos presentes na colônia, redistribuindo esses compostos para todos os indivíduos dessa colônia, através do contato, explicando dessa forma o perfil homogêneo encontrado em cada colônia estudada. Essa homogeneidade do perfil cuticular de cada colônia fica evidente, nos resultados encontrados, nas altas porcentagens de correta alocação dos indivíduos dentro de seu grupo previsto. Isso mostra que a maior parte dos indivíduos colocados dentro de um determinado grupo apresenta o perfil químico cuticular mais próximo dos demais indivíduos desse grupo do que quando comparados aos indivíduos dos demais grupos.

Na verificação da influência da alimentação nas pistas utilizadas no reconhecimento, os resultados mostraram que, em *F. varia*, a convergência alimentar

não resulta em uma convergência no perfil cuticular dos indivíduos. Consequentemente, essa mudança alimentar não resulta em alterações nas porcentagens normais de rejeição de indivíduos não companheiros de ninho. Não são encontrados na literatura estudos relatando a influência da alimentação no reconhecimento em abelhas eussociais. No entanto, nas formigas Argentinas (*Linepithema humile*), Liang e Silverman (2000) relatam que o perfil cuticular dos indivíduos muda de acordo com a sua alimentação. Diferentemente das abelhas, essas formigas se alimentam de outros insetos (no caso específico do estudo, baratas). Os autores relatam que nesse estudo, as formigas adquiriram alguns compostos cuticulares dos insetos ingeridos e esses compostos foram importantes no reconhecimento de não companheiros de ninho. Entretanto, nesse caso, existe a possibilidade da aquisição dos compostos cuticulares ter sido ocasionada pelo contato dessas formigas com suas presas e não pela ingestão da mesma.

Nos testes realizados com indivíduos isolados da colônia durante dez dias, tanto naqueles que investigaram a influência da alimentação quanto nos que visaram elucidar a influência dos materiais do ninho, as análises químicas resultaram na completa separação entre os grupos teste e controle. No caso dos testes com a alimentação, os indivíduos permaneceram sem contato com materiais provenientes do ninho, como o cerume. Segundo D'Ettorre *et al.*, (2006) as pistas de reconhecimento são constantemente renovadas, dessa forma, a separação entre os grupos pode ter sido ocasionada não pela diferente dieta, mas sim pela ausência de renovação dos compostos cuticulares com o perfil da colônia original. Comparando-se os perfis químicos encontrados nos testes dos indivíduos que permaneceram com o material de ninho e dos indivíduos que permaneceram apenas com o alimento, estes últimos não possuem um dos compostos encontrados no primeiro grupo. Isso pode indicar que o material do ninho, além de alterar a concentração dos compostos cuticulares, também pode

acrescentar novos compostos à lista do perfil individual. Ainda, o fato dos dois grupos de indivíduos tratados com material do ninho (controle e teste) apresentarem o mesmo composto, que é ausente nos testes com o alimento, indica que se trata de uma substância comum às duas colônias fornecedoras do material para os testes.

Os testes de reconhecimento realizados concordam com os resultados obtidos, na mesma espécie do presente estudo, por Couvillon e Ratnieks (2008). Segundo esses autores, os indivíduos de *F. varia* reconhecem pistas indesejadas no perfil cuticular daqueles não companheiros de ninho, e essas pistas são as responsáveis pela rejeição desses indivíduos. Nessa proposta, a aceitação se dá não pela presença das pistas desejadas, mas sim pela ausência das indesejadas.

6. Bibliografia

- Abdalla, F. C.; Jones, G. R.; Morgan, E. D. e Cruz-Landim, C. da. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genetics and Molecular Research*, **2**, 191-199.
- Aitchison, J. 1986. The Statistical Analysis of Compositional Data. London: Chapman & Hall.
- Alcock, J. 1993. Animal Behavior: An Evolutionary Approach, 5th edn. Sunderland, MA: Sinauer. 544 p.
- Andersen, S.O.; Thompson, P. R. e Hepburn, H. R. 1981. Cuticular sclerotization in the honeybee (*Apis mellifera adansonii*). *Journal of Comparative Physiology*, **145**, 17-20.
- Arnold, G.; Quenet, B.; Cornuet, J-M.; Masson, C.; De Schepper, B.; Estoup, A. e Gasqui, P. 1996. Kin recognition in honeybees. *Nature*, **379**, p. 498.
- Bartelt, R. J.; Arnold, M. T.; Schaner, A. M. e Jackson, L. L. 1986. Comparative analysis of cuticular hydrocarbons in the *Drosophila virilis* species group. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **83**, 731-742.
- Beecher, M. D. 1982. Signature systems and kin recognition. *American Zoologist*, **22**, 477-490.
- Bowden, R. M.; Garry, M. F. e Breed, M. D. 1994. Discrimination of con- and heterospecific bees by *Trigona (Tetragonisca) angustula* guards. *Journal of the Kansas Entomological Society*, **67**, 137-139.
- Breed, M. D. 1983. Nestmate recognition in honey bees. *Animal Behaviour*, **31**, 86-91.
- Breed, M. D. e Page, R. E. 1991. Intraspecific and interespecific nestmate recognition in *Melipona* workers (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Insect Behavior*, **4**, 463-469.
- Breed, M. D. e Stiller, T. M. 1992. Honey bees, *Apis mellifera*, nestmate discrimination: hydrocarbon effects and the evolutionary implications of comb choice. *Animal Behaviour*, **43**, 875-883.
- Breed, M. D.; Garry, M. F.; Pearce, A. N.; Hibbard, B. E.; Bjostad, L. B. e Page, R. E., Jr. 1995. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Animal Behaviour*, **50**, 489-496.
- Breed, M. D. 2003. Nestmate recognition assays as a tool for population and ecological studies in eusocial insects: A review. *Journal of the Kansas Entomological Society*, **76**, 539-550.
- Breed, M. D.; Perry, S. e Bjostad, L. B. 2004. Testing the blank slate hypothesis: why honey bee colonies accept young bees. *Insectes Sociaux*, **51**, 12-16.
- Brian, M. V. 1986. Bonding between workers and queens in the ant genus *Myrmica*. *Animal Behaviour*, **34**, 1135-1145.
- Buchwald, R. e Breed, M. D. 2005. Nestmate recognition cues in stingless bee, *Trigona fulviventris*. *Animal Behaviour*, **70**, 1331-1337.
- Carlin, N. F. e Hölldobler, B. 1983. Nestmate and kin recognition in interspecific mixed colonies of ants. *Science*, **222**, 1027-1029.

- Carlin, N. F. e Hölldobler, B. 1986. The kin recognition system of carpenter ants (*Camponotus spp.*), I: hierarchial cues in small colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **19**, 123–134.
- Carlin, N. F. 1989. Discrimination between and within colonies of social insects: Two null hypotheses. *Netherlands Journal of Zoology*, **39**, 86-100.
- Carlson, D. A.; Nelson, D. R.; Langley, P. A.; Coates, T. W.; Davis, T. L.; Leegwater-Vander Linden, M. 1984. Contact sex pheromone in the tsetse fly *Glossina pallidipes* Austen: identification and synthesis. *Journal of Chemical Ecology*, **10**, 429–450.
- Clément, J-L. e Bagnères, A. G. 1998. Nestmate recognition in termites. In: *Pheromone communication in social insects* (Vander Meer, R. K., Breed, M. D., Winston, M. L., Espelie, E. K., eds). Westview, Boulder, pp. 57-58.
- Cobb, M. e Ferveur, J. F. 1996. Evolution and genetic control of mate recognition and stimulation in *Drosophila*. *Behavioural Processes*, **35**, 35–54.
- Couvillon, M. J. e Ratnieks, F. L. Odour transfer in stingless bee *Frieseomelitta varia* demonstrates guards use an “undesirable-absent” recognition system. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. **No prelo**.
- D’Ettorre, P.; Wenseleers, T.; Dawson, J.; Hutchinson, S. e Ratnieks, F. L. W. 2006. Wax combs mediate nestmate recognition by guard honeybees. *Animal Behaviour*, **71**, 773-779.
- Downs, S. G. e Ratnieks, F. L. W. 1999. Recognition of conspecifics by honeybee guards uses nonheritable cues acquired in the adult stage. *Animal Behaviour*, **58**, 643-648.
- Endler, A.; Liebig, J.; Schmitt, T.; Parker, J. E.; Jones, G. R.; Schreier, P. e Hölldobler, B. 2004. Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 2945-2950.
- Estoup, A.; Solignac, M. e Cornuet, J-M. 1994. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honey bee colonies. *Proceedings of the Royal Society of London*, **258**, 1-7.
- Free, J. B. 1961. The Social Organisation of the Bumble-bee Colony. Fleet, Hants, U.K.: The Central Association of Bee-Keepers.
- Gadagkar, R. 1985. Kin recognition in social insects and other animals – a review of recent findings and a consideration of their relevance for the theory of kin selection. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Animal Sciences)*, **94**, 587–621.
- Gamboa, G. J.; Reeve, H. K. e Pfennig, D. W. 1986a. The evolution and ontogeny of nestmate recognition in social wasps. *Annual Review of Entomology*, **31**, 431–454.

- Gamboa, G. J.; Reeve, H. K.; Ferguson, I. e Wacker, T. L. 1986b. Nestmate recognition in social wasps: the origin and acquisition of recognition odours. *Animal Behaviour*, **34**, 685–695.
- Gamboa, J. G.; Grudzien, T. A.; Espelie, K. E. e Bura, E. A. 1996. Kin recognition in social wasps: combining chemical and behavioural evidence. *Animal Behaviour*, **51**, 625–629.
- Gamboa, G. J. 1996. Kin recognition in social wasps. In: *Natural History and Evolution of Paper Wasps* (Turillazzi, S e West-Eberhard, M. J., eds.) Oxford University Press, UK, pp. 161–177.
- Ginzel, M. D.; Blomquist, G. J.; Millar, J. G. e Hanks, L. M. 2003. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 533–545.
- Greenberg, L. 1979. Genetic component of bee odor in kin recognition. *Science*, **206**, 1095–1097.
- Hamilton, W.D. 1964a. The genetical evolution of social behavior I *Journal of Theoretical Biology*, **7**, 1–16.
- Hamilton, W.D. 1964b. The genetical evolution of social behavior II. *Journal of Theoretical Biology*, **7**, 17–52.
- Hangartner, W.; Reichson, J. M. e Wilson, E. O. 1970. Orientation to nest material by the ant, *Pogonomyrex badius* (Latreille). *Animal Behaviour*, **18**, 331–334.
- Haskins, C. P. e Haskins, E. F. 1983. Situation and location-specific factors in the compatibility response in *Rhytidoponera metallica* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Psyche*, **90**, 163–174.
- Hepper, P. G. 1986. Kin recognition: functions and mechanisms. *Biological Reviews*, **61**, 63–93.
- Hölldobler, B. e Wilson, E. O. 1990. The Ants. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 746 p.
- Howard, R. W. 1992. Comparative analysis of cuticular hydrocarbons from the ectoparasitoids *Cephalonomia waterstoni* and *Laelius utilis* (Hymenoptera: Bethyridae) and their respective hosts, *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae) and *Trogoderma variabile* (Coleoptera: Dermestidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **85**, 317–325.
- Howard, R. W. 1993. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: *Insect lipids: chemistry ,biochemistry and biology* (Stanley-Samuelson, D. W. e Nelson, D. R., eds) University of Nebraska Press. Lincoln, pp 179–226.
- Howard, R. W. e Liang, Y. 1993. Cuticular hydrocarbons of winged and wingless morphs of the ectoparasitoid *Choetospila elegans* Westwood (Hymenoptera: Pteromalidae) and its host, larval lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*) (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **106**, 407–414.

- Howard, R. W. 1998. Ontogenetic, reproductive, and nutritional effects on the cuticular hydrocarbons of the host-specific ectoparasitoid *Cephalonomia tarsalis* (Hymenoptera: Bethyridae). *Annals of the Entomological Society of America*, **91**, 101–112.
- Howard, R. W.; Pérez-Lachaud, G. e Lachaud, J-P. 2001. Cuticular hydrocarbons of *Kapala sulcifacies* (Hymenoptera: Eucharitidae) and its host, the ponerine ant *Ectatomma ruidum* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **94**, 707–716.
- Howard, R. W. e Pérez-Lachaud, G. 2002. Cuticular hydrocarbons of the ectoparasitic wasp *Cephalonomia hyalinipennis* (Hymenoptera: Bethyridae) and its alternative host, the stored product pest *Caulophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **50**, 75–84.
- Howard, R. W. e Baker, J. E. 2003. Cuticular hydrocarbons and wax esters of the ectoparasitoid *Habrobracon hebetor*: ontogenetic, reproductive and nutritional effects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **53**, 1–18.
- Howard, R. W.; Jackson, L. L.; Banse, H. e Blows, M. W. 2003. Cuticular hydrocarbons of *Drosophila birchii* and *D. serrata*: identification and role in mate choice in *D. serrata*. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 961–976.
- Howard, R. W. e Blomquist, G. J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual review of entomology*, **50**: 371-393.
- Hubbard, M. D. 1974. Influence of nest material and colony odour on digging in the ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of the Georgia Entomological Society*, **9**, 127–132.
- Imperatriz-Fonseca, V. L. e Zucchi, R. 1995. Virgin Queens in Stingless Bees (Apidae, Meliponinae) Colonies: A Review. *Apidologie*, **26**, 231-244.
- Inoue, T.; Roubik, D. W. e Suka, T. 1999. Nestmate recognition in the stingless bee *Melipona panamica* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, **46**, 208-218.
- Jackson, L.L. e Bartelt, R. J. 1986. Cuticular hydrocarbons of *Drosophila virilis*: comparison by age and sex. *Insect Biochemistry*, **16**, 433–439.
- Jallon, J-M. e David, J. R. 1987. Variations in cuticular hydrocarbons among the eight species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Evolution*, **41**, 294–302.
- Jungnickel, H.; da Costa, A. J. S.; Tentschert, J. Patricio, E. F. L. R. A.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Drijfhout, F. e Morgan, E. D. 2004. Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Physiology*, **50**, 761-766.
- Jutsum, A. R.; Saunders, T. S. e Cherrett, J. M. 1979. Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Animal Behaviour*, **27**, 839–844.

- Kirchner, W. H. e Friebe, R. 1999. Nestmate discrimination in the African stingless bee *Hypotrigena gribodoi* Magretti (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, **30**, 293-298.
- Lange, R. 1960. Über die Futterweitergabe zwischen angehörigen verschiedener Waldameisenstaaten. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, **17**, 389-401.
- Liang, D. e Silverman, J. 2000. "You are what you eat": Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften*, **87**, 412-416.
- Lockey, K. H. 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comparable Biochemistry and Physiology*, **89B**, 595-645.
- Lorenzi, M. C.; Bagnères, A. G. e Clément, J. L. 1996. The role of cuticular hydrocarbons in social insects: is it the same in paper wasps?. In: *Natural History and Evolution of Paper Wasps* (Turillazzi, S. e West-Eberhard, M. J., eds.) Oxford University Press, UK, pp. 178-189.
- Mintzer, A. 1982. Nestmate recognition and incompatibility between colonies of the acacia-ant *Pseudomyrmex ferruginea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **10**, 165-168.
- Mintzer, A. e Vinson, S. B. 1985. Kinship and incompatibility between colonies of the acacia-ant *Pseudomyrmex ferruginea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **17**, 75-78.
- Monnin, T.; Malosse, C. e Peeters, C. 1998. Solid-phase microextraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadricaps*. *Journal of Chemical Ecology*, **24**, 473-490.
- Moritz, R. F. A. e Heisler, T. 1992. Super and half-sister discrimination by honey-bee workers (*Apis mellifera*) in a trophallactic bioassay. *Insectes Sociaux*, **39**, 365-372.
- Nelson, D. R. e Carlson, D. A. 1986. Cuticular hydrocarbons of the tsetse flies *Glossina morsitans*, *G. austeni* and *G. pallidipes*. *Insect Biochemistry*, **16**, 403-416.
- Nelson, D. R.; Carlson, D. A. e Fatland, C. L. 1988. Cuticular hydrocarbons of the tsetse flies. II. *G. p. palpalis*, *G. p. gambiensis*, *G. fuscipes*, *G. tachinoides*, and *G. brevipalpis*. *Journal of Chemical Ecology*, **14**, 963-987.
- Nunes, T. M.; Nascimento, F. S.; Turatti, I. C. Lopes, N. P. e Zucchi, R. 2008. Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? *Animal Behaviour*, **doi:10.1016/j.anbehav.2007.08.028**.
- Nunes, T. M.; Turatti, I. C.; Mateus, S.; Nascimento, F. S.; Lopes, N. P. e Zucchi, R. 2008. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. *Submetido para publicação no periódico Genetics and Molecular Research*.
- Obin, M. S. e Vander Meer, R. K. 1988. Sources of nestmate recognition cues in the imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Animal Behaviour*, **36**, 1361-1370.

- Peeters, C.; Monnin, T. e Malosse, C. 1999. Cuticular hydrocarbons correlated with reproductive status in a queenless ant. *Proceedings of the Royal Society of London*, **266**, 1323–1327.
- Pfennig, D. W.; Gamboa, G. J.; Reeve, H. K.; Shellman-Reeve, J. e Ferguson, I. D. 1983. The mechanism of nestmate discrimination in social wasps (Polistes, Hymenoptera: Vespidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **13**, 299–305.
- Pianaro, A.; Flach, A.; Patricio, E. F. L. R. A. ; Nogueira-Neto, P. e Marsaioli, A. J. 2007. Chemical changes associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. *Journal of Chemical Ecology*, **33**, 971-984.
- Provost, E. 1985. Etude de la fermeture de la société chez les fourmis, I: analyse des interactions entre ouvrières de sociétés différentes, lors de recontres expérimentales, chez des fourmis du genre *Leptothorax* et chez *Camponotus lateralis* Ol. *Insectes Sociaux*, **32**, 445–462.
- Provost, E. 1987. Role of the queen in the intra-colonial aggressivity and nestmate recognition in *Leptothorax lichtensteini* ants. In: *Chemistry and Biology of Social Ants* (Eder, J. e Rembold, H. eds.), p. 479. Munich: Verlag.
- Sakagami, S.F. 1982. Stingless bees. In: *Social Insects* (Hermann, H.R. ed.), Academic Press, New York, pp. 361-423.
- Sherman, P. W. e Holmes, W. G. 1985. Kin recognition: issues and evidence. *Fortschritte der Zoologie*, **31**, 437-460.
- Singer, T. L. e Espelie, K. E. 1992. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. *Animal Behaviour*, **44**, 63-68.
- Singer, T. L. Espelie, K. E. Gamboa, G. J., 1998. Nest and nestmate discrimination in independent-founding wasps. In: *Pheromone communication in social insects* (Vander Meer, R. K.; Breed, M. D.; Winston, M. L. e Espelie, E. K., eds). Westview, Boulder, pp. 104-125.
- Sokal, R. R. e Rohlf, F. J. 1995. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research , 3 ed. W.H. Freeman , New York , 887p.
- Steinmetz, I; Schmolz, E. e Ruther, J. 2003. Cuticular lipids as trail pheromone in a social wasp. *Proceedings of the Royal Society of London*, **270**, 385-391.
- Stuart, R. J. 1987. Individual workers produce colony-specific nestmate recognition cues in the ant, *Leptothorax curvispinosus*. *Animal Behaviour*, **35**, 1062–1069.
- Suka, T. e Inoue, T. 1993. Nestmate recognition of the stingless bee *Trigona* (*Tetragonula*) *minangkabau* (Apidae: Meliponinae). *Journal of Ethology*, **11**, 141–147.
- Sutton, B. D. e Carlson, D. A. 1997. Cuticular hydrocarbons of Glossina: subgenera Glossina and Nemorhina. *Journal of Chemical Ecology*, **23**, 1291–1320.
- Thompson, P. R. 1978. Histological development of cuticle in the worker honeybee, *Apis mellifera adansonii*. *Journal of Apicultural Research*, **17**, 32-40.

- Thompson, P. R. e Hepburn, H. R. 1978. Changes in chemical and mechanical properties of honeybee (*Apis mellifera adansonii* L.) cuticle during development. *Journal of Comparative Physiology*, **126**, 257-262.
- Toolson, E. C. e Kuper-Simbron, R. 1989. Laboratory evolution of epicuticular hydrocarbon composition and cuticular permeability in *Drosophila pseudoobscura*: effects on sexual dimorphism and thermal acclimation ability. *Evolution*, **43**, 468–473.
- Vander Meer, R. K., Morel, L. 1998. Nestmate recognition in ants. In: *Pheromone communication in social insects* (Vander Meer, R.K.; Breed, M. D.; Winston, M.L. e Espelie, E. K., eds). Westview, Boulder, pp. 79-103.
- Wilson, E.O. 1971. *The insect societies*. Belknap Press. Harvard University Press. Cambridge Massachusetts, 548p.

ANEXOS

Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance?

TULIO M. NUNES*, FABIO S. NASCIMENTO*†, IZABEL C. TURATTI‡, NORBERTO P. LOPES‡ & RONALDO ZUCCHI*

*Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

†Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe

‡Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

(Received 18 January 2007; initial acceptance 11 April 2007;

final acceptance 15 August 2007; published online ■ ■ ■; MS. number: A10676RZ)

The ability to discriminate nestmates from non-nestmates is critical to the maintenance of the integrity of social insect colonies. Guard workers compare the chemical cues of an incoming individual with their internal template to determine whether the entrant belongs to their colony. In contrast to honeybees, *Apis mellifera*, stingless bees have singly mated queens and, therefore, are expected to have a higher chemical homogeneity in their colonies. We tested whether aggressive behaviour of *Friesomelitta varia* guards towards nestmate and non-nestmate foragers reflects chemical similarities and dissimilarities, respectively, of cuticular hydrocarbon profiles. We also introduced individuals of *Lestrimelitta limao*, an obligatory robber species, to test the ability of guards to react effectively to intruders from other taxa. We verified that foraging nestmates were almost invariably accepted, while heterospecific and conspecific non-nestmates were rejected at relatively high rates. However, non-nestmate individuals with higher chemical profile similarity were likely to be accepted by guards. We conclude that guards compare the chemical cuticular blend of incoming individuals and make acceptance decisions according to the similarity of the compounds between the colonies.

© 2007 The Association for the Study of Animal Behaviour. Published by Elsevier Ltd.

Keywords: chemical ecology; cuticular hydrocarbon; *Friesomelitta varia*; kin selection; *Lestrimelitta limao*; nestmate recognition; recognition system; social insect; stingless bee

The ability to recognize and discriminate nestmates, non-nestmates and heterospecific individuals is critical to the maintenance of the integrity of social insect colonies against parasites, kleptobiotics and robber conspecifics. Selection favours efficient recognition systems that use detectable, discriminatory and memorable cues (Guilford & Dawkins 1991; Sherman et al. 1997). There is abundant evidence indicating that recognition is mediated by olfactory cues in social insects (Wilson 1971; Hölldobler & Michener 1980; Breed & Bennett 1987). These cues are both endogenously produced and environmentally obtained from food, nest material or other sources (Moritz & Heisler 1992; Downs & Ratnieks 1999).

Correspondence: F. S. Nascimento, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão (SE) 49100-000, Brazil (email: fabio.nascimento@pesquisador.cnpq.br).

In social bees and wasps, chemical compounds are acquired from the comb and transferred among nestmates that are in physical contact, resulting in a homogeneous colony odour (Breed et al. 1995; Gamboa 1996). Each colony member learns a colony-specific odour as an internal representation or 'template' (Crozier & Pamilo 1996; Gamboa 2004). Guard workers compare the label of an incoming individual with her internal template to determine whether the entrant belongs to her colony. The adaptive threshold model (Sherman et al. 1997) predicts that if the difference between the template and the odour of the incoming individual is above a certain level, the nest guards will behave aggressively. In a recognition system based on chemical profiles, guards should accept all nestmates and reject all non-nestmates (Sherman et al. 1997). However, discrimination may not always be as straightforward as this, because guards may use a range of phenotypes to avoid rejecting a nestmate. A flexible

threshold might result in the acceptance of more non-nestmate individuals (Downs & Ratnieks 2000).

Several studies show that cuticular hydrocarbons are the main chemical compounds responsible for discrimination between nestmates and non-nestmates (Pfennig et al. 1983; Breed & Stiller 1992; Singer & Espelie 1992; Gamboa et al. 1996; reviewed in Howard & Blomquist 2005). In honeybees, *Apis mellifera*, the principal substances used as cues in recognition behaviour are linear alkanes, methyl branched alkanes, alkenes, free fatty acids and some fatty acid esters (Breed & Stiller 1992; Breed et al. 1995; Breed et al. 1998). Workers acquire their nestmate recognition-cue profile from the wax in their natal colony shortly after emergence as adults (Breed et al. 1998; D'Ettorre et al. 2006). Another study shows that honeybees treated with certain hydrocarbons (especially alkenes) were well discriminated by nestmates (Dani et al. 2005).

However, as epicuticular hydrocarbon profiles are in part genetically determined, the variability of these compounds should differ between subfamilies because of the polyanthropy of honeybees (Arnold et al. 1996, 2000). It is well known that honeybee workers are able to distinguish full sisters and will feed them more frequently than half-sisters (Moritz & Heisler 1992). In contrast, stingless bees usually have one singly mated queen (reviewed in Strassmann 2001). This finding suggests that stingless bees have a higher chemical homogeneity in their colonies than do honeybees.

Compared with studies of honeybees, studies focusing on the chemical cues of nestmate recognition in stingless bees are still lacking. However, there is evidence that *Scaptotrigona bipunctata* workers from different colonies show clear differences in cuticular hydrocarbon profiles, and that guard bees show the ability to discriminate between nestmates and non-nestmates (Jungnickel et al. 2004). Recently, Buchwald & Breed (2005) investigated nestmate discrimination in *Trigona fulviventris*, and verified that isolated substances, such as fatty acids and hydrocarbons, could influence nestmate recognition. Other reports have verified the discriminative abilities of some species of stingless bee, but did not report the role of cuticular compounds in nestmate discrimination (*Melipona quadrifasciata*, *Melipona scutellaris*, *Melipona rufiventris*: Breed & Page 1991; *Tetragonisca angustula*: Bowden et al. 1994; *Tetragonula minangkabau*: Suka & Inoue 1993; *Hypotrigona gribodoi*: Kirchner & Friebe 1999). In *Melipona panamica*, genetic relatedness, age and risk of predation all affect responses of discriminating guards (Inoue et al. 1999).

In this study, we investigated nestmate recognition in the stingless bee *Frieseomelitta varia*. First, we compared the ability of guards to discriminate nestmates from conspecifics and heterospecific non-nestmates. As a standard of heterospecific non-nestmates, we used foraging individuals of the obligate cleptobiotic bee *Lestrimelitta limao*. This is an ideal model because previous studies reported that *L. limao* avoids robbing *Frieseomelitta* nests (Roubik 1989; Sakagami et al. 1993), which suggests an efficient defensive behaviour of nest guards. Second, we investigated whether nonaggressive guard behaviour towards introduced individuals would reflect chemical similarities between

colonies under natural conditions. We predicted that discriminator guards would be more likely to reject conspecific individuals from different colonies when the conspecifics' odour phenotypes differed from those of the guard (Sherman et al. 1997) than when they had similar chemical profiles.

METHODS

Species and Study Site

Frieseomelitta varia (sensu Moure 1961 and Silveira et al. 2002) is a small-sized stingless bee (0.5–0.6 mm length) that constructs clustered-cell nests without an involucre. As in some other stingless bees (Roubik 1989), this species can be a facultative usurper. Under laboratory conditions, foreign foragers have occasionally invaded conspecific nests and taking pollen from pots (Nogueira-Neto 1997). Nest defence is performed by guard workers that sit on the tube entrance and deposit resin on any predator or robber that attacks the nest.

We conducted the study during May–June 2005 and used four colonies of *F. varia* and one colony of *L. limao* in the experiments. The *F. varia* colonies had approximately equal numbers of workers (500–600 individuals) and were hived inside the laboratory in wooden frames (45 × 20 × 10 cm) with the two larger sides made of glass. Each hive was connected to the external environment through plastic tubes, allowing the workers to forage freely. A cardboard platform was provided under each nest entrance to support an experimental vial (see Recognition experiments). The nest of *L. limao* was located inside the hollow of a tree on the Ribeirão Preto campus of Universidade de São Paulo.

Recognition Experiments

Using a clean aspirator, we collected foraging bees from the four colonies as they returned to their respective nests. The captured individuals were cooled at 5°C and marked with paint on the thorax by a team member different from the collector of the behavioural data, who was thus unaware of the origin of the subjects. Each bee was then introduced into a small glass vial (3.5 × 2.0 cm), which was placed with the open end aligned with the entrance to the discriminator nest during assays. Neither the empty vial nor the marking paint affected the behaviour of guards in pilot trials. Individuals were tested only once in each trial. Observations were conducted when a large number of bees were guarding the entrance, and only one introduction per colony was performed per day.

Nestmate and Non-nestmate Assays

Nestmate experiments consisted of introducing 20 individuals to the guard bees of their own colony. Non-nestmate experiments were carried out using 20 individuals from colony 1 as the source of non-nestmates bees and presenting them to the guard bees of the discriminator colonies (nests 2–4). Nestmates and non-nestmates were

used randomly during the experiments. Responses of guards were considered aggressive when guards bit introduced bees on the legs, head or wings, or attempted to immobilize them or deposit resin; the absence of hostile behaviour, and mild antennation and nest entry were considered acceptance by guards. The intervals preceding the first aggression and the number of guard bees in nest entrances were also recorded.

Heterospecific Assays

Lestrimelitta limao is an essentially cleptobiotic bee that exploits the resources of other stingless bees. Their hosts immediately recognize them as intruders and initiate a massive attack (Sakagami et al. 1993). Although *F. varia* colonies are not invaded by *L. limao*, *F. varia* guards should be able to recognize them as a potential enemy. Therefore, the results of these trials were contrasted with the reaction of *F. varia* guards to non-nestmate conspecifics. Here, 20 *L. limao* workers were presented to the *F. varia* discriminator colonies, and the behaviours of the guards were recorded. We predicted that the discriminators' reaction to non-nestmates and to *L. limao* would not differ because guards would be equally efficient at discriminating both conspecific and heterospecific non-nestmates intruders from nestmates. Heterospecific assays were made 1 month after the conspecific experiments.

Data Analysis

Differences in the rates of acceptance of non-nestmates (conspecific and heterospecific) and nestmates by guards of different colonies were compared using a one-tailed Fisher's exact test because of the small number of introduced bees per colony. A Bonferroni correction was applied for an overall level of significance of 5% (Sokal & Rohlf 1995).

Chemical Analyses

During the experiments, 20 foraging workers of each colony of *F. varia* (80 samples) and 30 workers of *L. limao* were collected and freeze-killed. The hindlegs of *F. varia*

workers were removed to avoid contamination by resin or pollen. Workers from each colony were then individually placed inside a single flask and the cuticular compounds were extracted by washing with 500 µl of hexane for 1 min. Each sample extract was analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (SHIMADZU, model QP2010, Tokyo, Japan), equipped with a DB-5MS capillary column, using helium as the carrier gas. The temperature protocol was: 150–280°C at a rate of 3°C/min (held for 15 min). Analyses were performed in splitless mode and individual mass spectra were compared with Wiley library data (McLafferty et al. 2000).

Variation in Cuticular Hydrocarbons

For statistical analysis, the areas under the peaks of the chromatograms were transformed according to Reyment's formula ($Z = \ln(A_p/g(A_p))$), where A_p is the area of the peak, and $g(A_p)$ is the geometric mean peak area (Aitchison 1986). To reduce the number of variables, the corrected values of 26 peaks were examined by principal component analysis (PCA), and only the peaks that had the highest factorial weight on the first two roots were selected. The areas of these peaks were recalculated, taking into account the reduced data set, and then reanalysed by a stepwise discriminant analysis to separate bees according to colony membership. A Mann–Whitney *U* test was applied to verify whether workers from different colonies were characterized by different chemical compounds (Sokal & Rohlf 1995). Statistical analyses were conducted in Statistica 6.0 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, U.S.A.).

RESULTS

Recognition Experiments

As expected, guards accepted introduced nestmates at high rates ($\bar{X} \pm \text{SE}$: $98.75 \pm 1.5\%$; Fig. 1). Introduced non-nestmates were accepted significantly less frequently than nestmates by the discriminator guards of colony 3 (30% of individuals; Fisher's exact test: $P = 0.004$) and colony 4 (45% of individuals; Fisher's exact test: $P = 0.018$). However, guards of colony 2 accepted nestmates and

Figure 1. Acceptance of nestmates (NM; ■), conspecific non-nestmate from colony 1 (NN; ▨) and heterospecific (LL; □) by guards in three colonies of *Frieseomelitta varia*.

non-nestmates from colony 1 at similar rates (78% versus 98% of individuals; Fisher's exact test: $P = 0.17$). Unsurprisingly, guards of all colonies effectively rejected *L. limao* workers ($90.1 \pm 0.08\%$; 60 trials), but were less efficient in discriminating conspecific non-nestmates ($50.0 \pm 21\%$; 60 trials). The guards of colony 2 successfully rejected the heterospecific intruders, but accepted the non-nestmates from the colony 1 (79% versus 17%; Fisher's exact test: $P = 0.03$; Fig. 1). Guards of colonies 3 and 4 accepted non-nestmates and *L. limao* bees at a relatively low rate (colony 3: 28% versus 0.0%; Fisher's exact test: $P = 0.08$; colony 4: 43% versus 13%; Fisher's exact test: $P = 0.13$).

The latency to the first aggressive response against conspecific non-nestmates was significantly greater than that for heterospecific non-nestmates ($\bar{X} \pm \text{SE}$: *F. varia*: 63.80 ± 46.09 s; *L. limao*: 22.12 ± 17.01 s; paired *t* test: $t_{39} = 4.81$, $P < 0.001$). There were no significant differences in the number of guards at the entrances of the experimental colonies (chi-square test: $\chi^2_3 = 2.58$, $N = 20$, $P = 0.46$).

Chemical Analyses

The chemical composition of the cuticle of *F. varia* was characterized by a series of linear and mono-methyl branched alkanes with chains from 24 to 31 carbon atoms, corresponding alkenes, some fatty acids and fatty acid esters (Table 1). The most abundant compounds in *F. varia* were linear alkanes (*n*-C₂₇ and *n*-C₂₉) and an oleic acid ester. We detected a richer mixture of hydrocarbons in *L. limao*. Alkenes and shorter linear alkanes (*n*-C₁₉ and *n*-C₂₃) were found only in *L. limao*, while fatty acid esters were exclusively in the *F. varia* epicuticular composition (Table 1).

Variation in Cuticular Compounds

The transformed areas of 14 peaks selected for analysis produced three principal components (PCA) that explained 67% of the observed variability. Stepwise discriminant analysis of the 10 main compounds separated significantly the individuals according to nest membership (global model: Wilk's $\lambda = 0.008$, $F_{30,24} = 3.31$, $P < 0.0018$). The function led to 95.45% correct allocation of individuals to their own colony. The plot of the first versus the second root of the discriminant analysis (Fig. 2) revealed that individuals of colony 2 were not completely segregated from those of colony 1 (colony 1 versus colony 2: Mahalanobis distance = 15.37, $F_{10,18} = 0.86$, $P = 0.59$). However, workers from colonies 3 and 4 were fully discriminated from the colony 1 based on their chemical profiles (colony 1 versus colony 3: Mahalanobis distance = 51.84, $F_{10,18} = 3.25$, $P = 0.05$; colony 1 versus colony 4: Mahalanobis distance = 49.73, $F_{10,18} = 3.74$, $P = 0.03$).

Comparative results using 3-Me C₂₇, 9- and 11- and 13-Me C₂₇, 3-Me C₂₉, *n*-C₂₈, *n*-C₂₄, 3-, 11-diMe C₂₉ and *n*-C₂₅ as independent variables showed that colonies were not completely separated using a single compound. Individuals from colony 1 differed significantly from other

Table 1. Cuticular compounds present in the stingless bees *Friesomelitta varia* and *Lestrimelitta limao*

Compounds	<i>Friesomelitta varia</i> (N=80 individuals)	<i>Lestrimelitta limao</i> (N=30 individuals)
Lauryl acetate		+
Nonadecene		+
Nonadecane (C ₁₉)		+
Palmitic acid	+	
Palmitic acid ethyl ester	+	
Palmityl acetate		+
9-Octadecene-1-ol	+	
Heneicosane (C ₂₁)		+
Linoleic acid	+	
Linoleic acid ethyl ester	+	
Oleic acid ethyl ester	++	
n-Butyl palmitate		+
Olealdehyde	+	
Docosadiene	+	
Tricosene		+
Tricosane (C ₂₃)		+
5-Methyltricosane		+
3-Methyltricosane		+
Tetracosane (C ₂₄)	+	+
Pentacosane		+
Pentacosane (C ₂₅)	+	+++
Hexacosane (C ₂₆)	+	+
3,11 and 3,13-Dimethylpentacosane		+
Z-Heptacosene		+
Heptacosane (C ₂₇)	+++	+++
9 and 11 and 13-Methylheptacosane	+	+
3-Methylheptacosane	+	
5-Methylheptacosane	+	
Octacosane		+
Octacosane (C ₂₈)	+	+
Nonacosene	+	+++
Nonacosane (C ₂₉)	+++	+
11 and 13 and 15-Methylnonacosane	+	
11,15 and 13,17-Dimethylnonacosane		+
3, 11-Dimethylnonacosane	+	
Tetradecanoic acid		+
3-Methylnonacosane	+	
Hentriacontene		+
Hentriacontane (C ₃₁)	+	+
11 and 13 and 15-Methylhentriacontane	+	+

1–5% = '+'; 5–10% = '++'; >10% = '+++'.

colonies in only 3-Me C₂₉ and *n*-C₂₄. Individuals from colony 1 had higher proportions of these substances than did individuals from colonies 3 and 4.

DISCUSSION

The present study clearly shows that stingless bee guards use chemical similarity to accept or reject incoming individuals. Foraging nestmates were almost invariably

Figure 2. Discriminant analysis of the cuticular hydrocarbon profiles of the individuals from experimental colonies (2–4) and the discriminator colony (1). ●: colony 1; □: colony 2; ◆: colony 3; △: colony 4.

accepted while heterospecific and conspecific non-nestmates were rejected at relatively high rates. Our results support the view that the ability of guard bees to discriminate non-nestmate and heterospecific intruders does not differ because guards used chemical matching in relation to their internal templates. Unsurprisingly, guards took longer to react aggressively to conspecific non-nestmates than they did to heterospecific individuals. Chemical analyses of cuticular compounds confirmed that acceptance was correlated with chemical similarity. The results thus confirm that these compounds, as in other social insects, provide reliable cues that are used in nestmate recognition by guard bees.

Previous studies have shown that the cuticle surface can also carry genetic information (Arnold et al. 1996). Therefore, stingless bees should present a more homogeneous intracolony chemical profile because the queen mates only with a single male, in contrast to honeybees, in which queens will mate with up to 27 drones (Palmer & Oldroyd 2001; Strassmann 2001). Our results demonstrate considerable richness of compounds found in *F. varia*. A similar pattern of cuticular chemicals has been recorded in other species, such as *Melipona bicolor* (Abdalla et al. 2003) and *S. bipunctata* (Jungnickel et al. 2004). In addition, some linear alkanes are present in all species studied, and are known to affect nestmate discrimination in these bees.

Honeybees acquire a chemical label immediately upon emergence and exposure to the comb wax (Breed 1998a, b; Breed et al. 2004; D'Ettorre et al. 2006). The process of odour acquisition in stingless bees seems to be similar because young individuals remain on brood combs and food pots for several days before beginning to forage. However, stingless bees use other materials, such as mud and plant resins to build their nests (Michener 1974). These resources may provide a much greater variety of chemical compounds that can be incorporated into their cuticle profiles, as shown both in the species studied here and in *S. bipunctata* (Jungnickel et al. 2004). Although similarities between cuticular compounds of honeybees

and stingless bees have been found, it is possible that the meliponine bees use a different range of recognition cues, including alkanes and floral oils (Buchwald & Breed 2005). However, the presence of floral oils does not affect the probability that nestmates or non-nestmates will be rejected by honeybee guards (Downs et al. 2000), and the specific influence of floral oils as olfactory cues in stingless bees is still unclear. On the other hand, various *Frieseomelitta* species collect floral resins to use as building material or to deposit at the nest entrance. Although several chemicals are present in resins (Roubik 1989), it has not been determined whether they influence nestmate recognition.

Although it is unclear how stingless bees acquire their chemical label, the compounds present in the wax of some *Trigona* species consist of varying proportions of hydrocarbons, esters and free acids (Blomquist et al. 1985; Milborrow et al. 1987). The waxes of different stingless bee species are chemically simpler with a higher percentage of hydrocarbons and a lower percentage of monoesters than the wax of *A. mellifera* (Koedam et al. 2002). These substances are found in the cuticular composition of *F. varia*, which suggests that acquisition of nestmate recognition cues could be determined primarily by the exposure of newly emerged bees to the wax.

In our study, nestmate recognition at the colony level was associated with chemical profiles of cuticular compounds. The responses of guard bees to non-nestmates can be explained by a hypothetical recognition system in which acceptance of the maximum number of nestmates is achieved, with a low degree of error. In the case of colony 2, there was no difference between acceptance rates of nestmates and non-nestmates, a pattern supported by chemical similarities (Fig. 2). In addition, unlike individuals from colonies 3 and 4, individuals from the colony 2 did not discriminate non-nestmates from colony 1 (source). This finding suggests that a much closer match between the phenotype of non-nestmates and the internal template of guards resulted in the greater acceptance rate by guards from colony 2. These results support the hypothesis that individuals are capable of not only recognizing the most important compounds, but are also able to compare different proportions of hydrocarbons and compare the chemical blending with their internal template (Crozier & Pamilo 1996). Indeed, a recent report demonstrated that when colonial odours change, guards update their internal templates (Couvillon et al. 2006).

The important novel aspect of this study is that some conspecific non-nestmate bees were rejected at rates similar to those of *L. limao* bees. Selection should favour recognition of obligatory robber bees based on the differences in their chemical compounds, and therefore, should maximize the efficiency of guards to reject intruders. In fact, the aggressive response against a conspecific non-nestmates was much lower than that for the robber bee. Guards were able to use resin to immobilize *L. limao* bees or to close the nest entrance with considerable efficiency. Obviously, obligate and opportunist conspecific robbers should behave differently during colony invasion. Raids by obligate robbers such as *L. limao* cause conspicuous disturbance to the attacked colonies, by enlarging

colony entrances and releasing large amount of neral and geranial terpenes (Blum et al. 1970), whereas raids by opportunist conspecific robbers should allow individuals to enter the nest undetected.

In this study we verified that guards compare the chemical cuticular blend of incoming individuals and make acceptance decisions according to the similarity of the chemical compounds between the colonies. Further studies are necessary to evaluate how stingless bees acquire and utilize specific compounds during the process of recognition.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. E.D. Morgan (University of Keele) and S.F. Ferrari (Federal University of Sergipe) for their valuable comments on the study and suggestions for the text. We also thank the referees for their comments on the manuscript. This research was supported by Fapesp (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo; Post-doctoral grant to F.S.N. proc. 02-12540-5).

References

- Abdalla, F. C., Jones, G. R., Morgan, E. D. & Cruz-Landim, C. 2003. Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genetics and Molecular Research*, **2**, 191–199.
- Aitchison, J. 1986. *The Statistical Analysis of Compositional Data*. London: Chapman & Hall.
- Arnold, G., Quenet, B., Cornuet, J. M., Masson, C., De Schepper, B., Estoup, A. & Gasqui, P. 1996. Kin recognition in honeybees. *Nature*, **379**, 498.
- Arnold, G., Quenet, B. & Masson, C. 2000. Influence of social environment on genetically based subfamily signature in the honeybee. *Journal of Chemical Ecology*, **26**, 2331–2333.
- Blomquist, G. J., Roubik, D. W. & Buchmann, S. L. 1985. Wax chemistry of two stingless bees of the *Trigonisca* group (Apididae: Meliponinae). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **82**, 137–142.
- Blum, M. S., Crewe, R. M., Kerr, W. E., Keith, L. H., Garrison, A. W. & Walker, M. M. 1970. Citral in stingless bees: isolation and functions in trail-laying and robbing. *Journal of Insect Physiology*, **16**, 1637–1648.
- Bowden, R. M., Garry, M. F. & Breed, M. D. 1994. Discrimination of con- and heterospecific bees by *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula* guards. *Journal of the Kansas Entomological Society*, **67**, 137–139.
- Breed, M. D. 1998a. Chemical cues in kin recognition: criteria for identification, experimental approaches, and the honey bee as an example. In: *Chemical Communication in Social Insects* (Ed. by R. K. Vander Meer, M. L. Winston, K. E. Espelie & M. D. Breed), pp. 57–78. Boulder, Colorado: Westview Press.
- Breed, M. D. 1998b. Recognition pheromones of the honey bee. *Bioscience*, **48**, 463–470.
- Breed, M. D. & Bennett, B. 1987. Kin recognition in highly eusocial insects. In: *Kin Recognition in Animals* (Ed. by D. J. C. Fletcher & C. D. Michener), pp. 243–285. New York: J. Wiley.
- Breed, M. D. & Page, R. E. 1991. Intraspecific and interspecific nestmate recognition in *Melipona* workers (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Insect Behavior*, **4**, 463–469.
- Breed, M. D. & Stiller, T. M. 1992. Honey bee, *Apis mellifera*, nestmate discrimination: hydrocarbon effect and the evolutionary implications of comb choice. *Animal Behaviour*, **43**, 875–883.
- Breed, M. D., Garry, M. F., Pearce, A. N., Hibbard, B. E., Bjostad, L. B. & Page, R. E. 1995. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Animal Behaviour*, **50**, 489–496.
- Breed, M. D., Leger, E. A., Pearce, A. N. & Wang, Y. J. 1998. Comb wax effects on the ontogeny of honey bee nestmate recognition. *Animal Behaviour*, **55**, 13–20.
- Breed, M. D., Perry, S. & Bjostad, L. B. 2004. Testing the blank slate hypothesis: why honey bee colonies accept young bees. *Insectes Sociaux*, **51**, 12–16.
- Buchwald, R. & Breed, M. D. 2005. Nestmate recognition cues in stingless bee, *Trigona fulviventris*. *Animal Behaviour*, **70**, 1331–1337.
- Couvillon, M. J., Caple, J. P., Endors, S. L., Kärcher, M., Russell, T. E., Storey, D. E. & Ratnieks, F. L. W. 2006. Nest-mate recognition template of guard honeybees (*Apis mellifera*) is modified by wax comb transfer. *Biology Letters*, **3**, 228–230.
- Crozier, R. H. & Pamilo, P. 1996. *Evolution of Social Insects*. Oxford: Oxford University Press.
- Dani, F. R., Jones, G. R., Corsi, S., Beard, R., Pradella, D. & Turillazzi, S. 2005. Nestmate recognition cues in the honey bee: differential importance of cuticular alkanes and alkenes. *Chemical Senses*, **30**, 477–489.
- D'Ettorre, P., Wenseleers, T., Dawson, J., Hutchinson, S. & Ratnieks, F. L. W. 2006. Wax combs mediate nestmate recognition by guard honeybees. *Animal Behaviour*, **71**, 773–779.
- Downs, S. G. & Ratnieks, F. L. W. 1999. Recognition of conspecifics by honeybee guards uses nonheritable cues acquired in the adult stage. *Animal Behaviour*, **58**, 643–648.
- Downs, S. G. & Ratnieks, F. L. W. 2000. Adaptive shifts in honey bee (*Apis mellifera* L.) guarding behavior support predictions of the acceptance threshold model. *Behavioral Ecology*, **11**, 326–333.
- Downs, S. G., Ratnieks, F. L. W., Jefferies, S. L. & Rigby, H. 2000. The role of floral oils in the nestmate recognition system of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, **31**, 357–365.
- Gamboa, G. J. 1996. Kin recognition in social wasps. In: *Natural History and Evolution of Paper Wasps* (Ed. by S. Turillazzi & M. J. West-Eberhard), pp. 161–177. Oxford: Oxford University Press.
- Gamboa, G. J. 2004. Kin recognition in eusocial wasps. *Annales Zoologici Fennici*, **41**, 789–808.
- Gamboa, G. J., Grudzien, T. A., Espelie, K. E. & Bura, E. A. 1996. Kin recognition pheromones in social wasps: combining chemical and behavioural evidence. *Animal Behaviour*, **51**, 625–629.
- Guilford, T. & Dawkins, M. S. 1991. Receiver psychology and the evolution of animal signals. *Animal Behaviour*, **42**, 1–14.
- Howard, R. W. & Blomquist, G. J. 2005. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, **50**, 371–393.
- Hölldobler, B. & Michener, C. D. 1980. Mechanisms of identification and discrimination in social hymenoptera. In: *Evolution of Social Behaviour* (Ed. by H. Markl), pp. 35–58. Weinheim: Verlag Chemie.
- Inoue, T., Roubik, D. W. & Suka, T. 1999. Nestmate recognition in the stingless bee *Melipona panamica* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, **46**, 208–218.
- Jungnickel, H., da Costa, A. J. S., Tentschert, J., Patrício, E. F. L. R. A., Imperatriz-Fonseca, V. L., Drijfhout, F. & Morgan, E. D. 2004. Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Physiology*, **50**, 761–766.
- Kirchner, W. H. & Friebe, R. 1999. Nestmate discrimination in the African stingless bee *Hypotrigona gribodoi* Magretti (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, **30**, 293–298.
- Koedam, D., Jungnickel, H., Tentschert, J., Jones, G. R. & Morgan, E. D. 2002. Production of wax by virgin queens of the stingless bee *Melipona bicolor* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, **49**, 229–233.

- McLafferty, F. W., Stauffer, D. A. & Loh, S. Y. 2000. *Registry of Mass Spectral Data*. 7th edn. New York: J. Wiley.
- Michener, C. D. 1974. *The Social Behavior of the Bees: a Comparative Study*. Cambridge, Massachusetts: Belknap, Harvard University Press.
- Milborrow, B. V., Kennedy, J. M. & Dollin, A. 1987. Composition of wax made by the Australian stingless bee *Trigona australis*. *Australian Journal of Biological Sciences*, **40**, 15–25.
- Moritz, R. F. A. & Heisler, T. 1992. Super and half-sister discrimination by honey-bee workers (*Apis mellifera*) in a trophallactic bioassay. *Insectes Sociaux*, **39**, 365–372.
- Moure, J. S. 1961. A preliminary supra-specific classification of the old world meliponine bees (Hymenoptera, Apidae). *Studia Entomologica*, **4**, 181–242.
- Nogueira-Neto, P. 1997. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. São Paulo: Editora Nogueirapis.
- Palmer, K. A. & Oldroyd, B. P. 2001. Mating frequency in *Apis florea* revisited (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux*, **48**, 40–43.
- Pfennig, D. W., Reeve, H. K. & Shellman, J. S. 1983. Learned component of nestmate discrimination in workers of a social wasp, *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). *Animal Behaviour*, **31**, 412–416.
- Roubik, D. W. 1989. *Ecology and Natural History of Tropical Bees*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sakagami, S. F., Roubik, D. W. & Zucchi, R. 1993. Ethology of the robber stingless bee, *Lestrimelitta limao* (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology*, **21**, 237–277.
- Sherman, P. W., Reeve, H. K. & Pfennig, D. W. 1997. Recognition systems. In: *Behavioural Ecology: an Evolutionary Approach* (Ed. by J. R. Krebs & N. B. Davies), pp. 69–96. Oxford: Blackwell Scientific.
- Silveira, F. A., Melo, G. A. R. & Almeida, A. B. 2002. *Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação*. 1st edn. Belo Horizonte: Fundação Araucária.
- Singer, T. L. & Espelie, K. E. 1992. Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. *Animal Behaviour*, **44**, 63–68.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995. *Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd edn. New York: W. H. Freeman.
- Strassmann, J. 2001. The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux*, **48**, 1–13.
- Suka, T. & Inoue, T. 1993. Nestmate recognition of the stingless bee *Trigona (Tetragonula) minangkabau* (Apidae: Meliponinae). *Journal of Ethology*, **11**, 141–147.
- Wilson, E. O. 1971. *The Insect Societies*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

*** Submetido para publicação no periódico *Genetics and Molecular Research***

**Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata*
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age.**

Running title: Cuticular hydrocarbons in stingless bees.

Authors: Túlio M. Nunes (1), Izabel C. C. Turatti (2), Sidnei Mateus (1), Fábio S. Nascimento (3), Norberto P. Lopes (2), Ronaldo Zucchi (1).

Addresses: (1) Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

(2) Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

(3) Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe.

* Corresponding author: Túlio Marcos Nunes

Tel.: +55-016-3602-3826; fax: +55-016-3602-3694.

E-mail address: tulionunes@pg.ffclrp.usp.br

Present address: Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP) 14040-901, Brazil.

Abstract

Chemical communication is of fundamental importance to maintain the integration of insect colonies. In honeybees, cuticular lipids present differences in their composition between queens, workers and drones. Little is known, however, about cuticular hydrocarbons in stingless bees. The aim of the present study was to provide more information on this subject by investigating chemical differences of cuticular hydrocarbons between different colonies, castes and individuals of different age in *Schwarziana quadripunctata*. The epicuticle of the bees was extracted using the non-polar solvent hexane, and analyzed by means of GC-MS. The identified compounds were alkanes, branched-alkanes and alkenes with chains of 19 to 33 carbon atoms. The discriminant analyses showed clear differences between all analyzed groups. There were significant differences between bees from different colonies, workers of different age and between workers and virgin queens.

Key words: hydrocarbons, chemical communication, social insect, stingless bees, *Schwarziana quadripunctata*.

Introduction

Communication is the action of one organism that modifies the behavior of another organism (Wilson, 1971). In social insects, a great part of a colony's behavior is mediated through chemical signals and cues (Singer, 1998; Howard and Blomquist, 2005) such as hydrocarbons associated with the cuticle of the colony members (Pfennig et al., 1983; Breed and Stiller, 1992; Singer and Espelie, 1992; Gamboa et al., 1996). The insect cuticle is covered by a thin waterproof layer of wax consisting of long chain lipids. According to Lockey (1988), these substances originally served as a protection against water loss. The pheromonal function of the hydrocarbons evolved later.

In social insects, the cuticle of each individual shows a unique chemical profile, carrying species specific cues, cues about its nest origin, age, genetic lineage, caste, sex, reproductive status and its function in the colony (Arnold et al., 1996; Howard and Blomquist, 2005; Monnin, 2006).

There is a steadily increasing number of studies on the chemical profiles of the cuticles of ants, social wasps, and honeybees (Vander Meer, et al., 1998). So far, however, little is known about the composition and the function of cuticular hydrocarbons in stingless bees. This group of highly eusocial bees, which comprises several hundred species (Michener, 2000), displays a great diversity not only concerning the nests architecture, but also in the materials used for the nest construction (Wille and Michener, 1973). Among different species we encounter a variety of different kinds of resins, mud and floral oils (Nogueira-Neto, 1997; Roubik, 2006). These materials might be the source of a richer chemical profile in comparison to other social bees.

Up to now, there are only few studies that investigated the composition and function of cuticular hydrocarbons in stingless bees (Abdalla et al., 2003; Jungnickel et al., 2004). For *Melipona bicolor*, Abdalla et al. (2003) reported both qualitative and quantitative differences in the chemical profile of the cuticle between different castes and sexes. Moreover, these authors found no differences between newly emerged workers and virgin queens, and that the chemical profile of the cuticle changed with the age of the individuals. Studies in *Scaptotrigona bipunctata* showed that each colony has its own chemical profile (Jungnickel et al., 2004). These results are concordant with the idea that the recognition of nestmates is mediated by olfactory cues presented by cuticular lipids (Buchwald and Breed, 2005).

The main compounds of the epicuticular surface of stingless bees are linear alkanes, metil-branched alkanes, and alkenes with chains from 23 to 35 carbon atoms (Abdalla et

al., 2003; Jungnickel et al., 2004; Pianaro et al., 2007). Some of these compounds are common to other social insects and may have a structural function while some, such as C25 and Z:C23, have been demonstrated to be used as chemical cues in recognition systems (Lockey, 1988; Buchwald and Breed, 2005).

The aim of the present study was to analyze the composition of the cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata*. We asked whether there are differences between colonies, and between individuals of different age and castes.

Material and methods

The study was performed in Ribeirão Preto, Brazil, during May to July of 2006. For the chemical analyses, two colonies of *Schwarziana quadripunctata* (henceforth colony A and B) were used. The colonies were housed in wooden boxes (20x32x13 cm) inside the laboratory. The boxes were connected to the external environment through plastic tubes, allowing the workers to forage. From colony A we collected 4 young workers (YW), 11 old workers (OW) and 11 virgin queens (VQ). From colony B we collected 5 young workers (YW), 4 old workers (OW) and 3 virgin queens (VQ). Young workers were individuals less than 4 days old, recognized by their bright coloration and by their activities on the brood cells. On the other hand, old individuals, which were at least 10 days old, were darkly pigmented. Virgin queens were considered non mated queens with intermediary pigmentation and were less than 10 days old (S. Mateus, personal observation). For the chemical analysis, the collected bees were stored individually in small vials and killed by freezing.

The epicuticular compounds were extracted in hexane (1ml per individual, 1 minute). After eliminating the solvent, the apolar extract was suspended in 50 µl of hexane for the analysis with a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer (GC-MS:

SHIMADZU, model QP2010). The GC-MS was equipped with a DB-5MS capillary column, using helium as carrier gas. The temperature protocol was: 150°C-280°C at a rate of 3°C/min (held for 15 min). Analyses were performed in splitless mode. For the identification of the compounds, the mass spectra were compared to Wiley library data (software: GCMSolutions for Windows, Shimadzu Corporation).

The areas under the peaks of the chromatograms were transformed according to Reyment's formula: $Z = \ln[A_p / g(A_p)]$, where A_p is the area of the peak, and $g(A_p)$ is the geometric mean peak area (Aitchison 1986). The subsequent statistical analysis was applied only to those substances with three or more samples for each group. Principal components analysis (PCA) was applied in order to reduce the number of variables. Only those peaks with the highest factorial weight on the first two roots were selected. Data were then analyzed by a stepwise discriminant analysis to verify segregations between the groups of the analyzed individuals. The statistical analyses were performed using the software Statistica 6.0 for Windows (StatSoft Inc).

Results

The chemical analysis of the cuticular hydrocarbons of *Schwarziana quadripunctata* identified a total of 35 substances divided into linear alkanes, methyl-branched alkanes and linear alkenes, with chains of between 19 and 33 carbon atoms (Table 1). The most abundant component of the cuticle were linear alkanes, mainly Tricosane (C23), Pentacosane (C25) and Heptacosane (C27). Young workers had a higher concentration of short chain hydrocarbons (e.g. Tricosane) than old workers and virgin queens (Table 1). The cuticle of young workers of colony A did not show several long chain hydrocarbons that were found in all other groups. The cuticle of old workers and virgin

queens presented a higher concentration of long chain hydrocarbons (like Heptacosane) than the cuticle of young workers.

Factor 1 of the principal component analysis using the analyzed 21 peaks described 30,33% of the observed variance. Factor 1 + factor 2 described 52,64%, and factor 1 + factor 2 + factor 3 described 68,80% of the total variance. Stepwise discriminant analysis of the main compounds significantly separated the individuals according to their group (Global model: Wilks's $\lambda = 0.008$, $F_{45, 43} = 7.07$, $p < 0.0001$). The classification based on the discriminant analysis revealed 100% of correct allocation of all individuals to their predicted group (Figure 1). The plot of the first versus the second roots of the discriminant analysis revealed that for both colonies all the groups were completely segregated. The Mahalanobis distance between the groups, the respective F-value and p-levels for each combination are listed in Table 2.

Discussion

Our data demonstrated a great diversity in the chemical compounds of the epicuticle of *Schwarziana quadripunctata* (Table 1). Compounds found in the cuticle clearly separated individuals according to their colony, age and caste (Figure 1). The identified compounds as well as their relative concentrations, mainly the higher abundance of linear alkanes, such as Tricosane, Pentacosane and Heptacosane, comply with the results for other stingless bees species (Abdalla et al., 2003; Jungnickel et al., 2004; Pianaro et al., 2007). Our study for the first time reveals hydrocarbons with less than 21 carbon atoms such as Nonadecane (C19) and Eicosane (C20) in stingless bees. Similar short chain hydrocarbons have already been identified in other social insects like wasps and honeybees (Singer, 1998; Fröhlich et al., 2000). However, their function is still unknown.

The cuticle of old workers of both colonies presented a higher concentration of the alkenes 7-Heptacosene, Z-Heptacosene and 9-Hentriacontene than that of young workers and virgin queens. Such alkenes probably are important factors for nestmate recognition. This can be deduced from experiments with honeybees where bees treated with alkenes were attacked more fiercely by nestmates than those treated with alkanes (Dani et al., 2005). Also, stingless bees of the specie *Trigona fulviventr* treated with Z-Tricosene induced a high level of aggression by nestmates (Buchwald and Breed, 2005). Old workers usually leave the colony looking for food and other resources. Hence, a different composition of alkenes could be used as recognition cues at the nest entrance. Studies on honeybees showed that adults emerge with their cuticle in a “blank slate”, lacking any recognition cue (Breed et al., 1995). The bees gain these cues (i.e. alkenes and fatty acids) after the exposure to the comb wax of their colony (Breed et al., 2004ab). Similarly, young workers of *S. quadripunctata* lacked some hydrocarbons that were identified in older bees. This difference is probably due to the fact that the young individuals were less time exposed to the wax of the nest than the old individuals, which resulted in a lower transfer of lipids between the nest material and the cuticle of young bees. A chemical analysis of the wax composition would give a deeper insight into this hypothesis. Also, recognition experiments using younger workers would verify if these chemical cues are important for the recognition system.

The results of the present study showed a clear difference between the chemical profile of the two colonies. This distinct chemical profile of a colony can be a result of different factors. Arnold et al., (1996) studying honeybees showed that different genetic lineages present different hydrocarbon profiles. Furthermore, the chemical profiles of colonies may reflect differences in the collected material such as floral scents, and in secreted substances like queen pheromones. The nest wax probably homogenizes the colony

odor by absorbing the chemical information from different sources, and by subsequently redistributing the joint information to the colony members (Breed et al., 1992; Breed et al., 1995).

Acknowledgments

We thank to Prof. Imperatriz-Fonseca for supplying the bees for chemical analyses. Michael Hrnčíř for the review of the manuscript. FAPESP financial support is acknowledged through aids provide to TMN (Proc. 05/58510-8) and RZ (04/09479-8, Programa Equipamentos Multi-usuários 2).

References

- Aitchison J (1986). The Statistical Analysis of Compositional Data. Chapman & Hall, London.
- Abdalla FC, Jones GR, Morgan ED, Cruz-Landim C (2003). Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1986 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. *Genetics and Molecular Research* 2: 191-199.
- Arnold G, Quenet B, Cornuet J and Masson C (1996). Kin recognition in honeybees. *Nature* 379: 498.
- Breed MD and Stiller TM (1992). Honey bee, *Apis mellifera*, nestmate discrimination: hydrocarbon effect and the evolutionary implications of comb choice. *Anim. Behav.* 43: 875-883.
- Breed MD, Stiller TM, Blum MS and Page RE (1992). Honeybee nestmate recognition - effects of queen fecal pheromones. *J. Chem. Ecol.* 18: 1633-1640.
- Breed MD, Garry MF, Pearce AN, Hibbard BE, et al. (1995). The role of wax comb in honey bee nest-mate recognition. *Anim. Behav.* 50: 489-496.

Breed MD, Perry S and Bjostad LB (2004a). Testing the blank slate hypothesis: why honey bee colonies accept young bees. *Ins. Soc.* 51: 12-16.

Breed MD, Diaz PH and Lucero KD (2004b). Olfactory information processing in honeybee, *Apis mellifera*, nestmate recognition. *Anim. Behav.* 68: 921-928.

Buchwald R and Breed MD (2005). Nestmate recognition cues in stingless bee, *Trigona fulviventr*is. *Anim. Behav.* 70: 1331-1337.

Dani FR, Jones GR, Corsi S, Beard R, et al. (2005) Nestmate recognition cues in the honey bee: Differential importance of cuticular alkanes and alkenes. *Chem. Senses* 30: 477-489.

Fröhlich B, Tautz J and Riederer M (2000). Chemometric classification of comb and cuticular waxes of the honeybee *Apis mellifera carnica*. *J. Chem. Ecol.* 26: 123-137.

Gamboa JG, Grudzien TA, Espelie KE and Bura EA (1996). Kin recognition in social wasps: combining chemical and behavioural evidence. *Anim. Behav.* 51: 625-629.

Howard RW and Blomquist GJ (2005). Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 50: 371–323.

Jungnickel H, da Costa AJS, Tentschert J, Patrício EFLRA, et al. (2004). Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). *J. Insect Physiol.* 50: 761-766.

Lockey KH (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B: 595-645.

Michener CD (2000). The bees of the World. University of Kansas Natural History Museum and Department of Entomology. The Johns Hopkins, University Press Baltimore and London, 913 pp.

Monnin T (2006). Chemical recognition of reproductive status in social insects. *Ann. Zool. Fennici* 43: 515-530.

Nogueira-Neto P (1997). Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. Editora Nogueirapis, São Paulo.

Pfennig DW, Reeve HK and Shellman JS (1983). Learned component of nestmate discrimination in workers of a social wasp, *Polistes fuscatus* (Hymenoptera: Vespidae). *Anim. Behav.* 31: 412–416.

Pianaro A, Flach A, Patricio EFLRA, Nogueira-Neto P, et al. (2007). Chemical changes associated with the invasion of a *Melipona scutellaris* colony by *Melipona rufiventris* workers. *J. Chem. Ecol.* 33: 970-984.

Roubik DW (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie* 37:124-143.

Singer TL and Espelie KE (1992). Social wasps use nest paper hydrocarbons for nestmate recognition. *Anim. Behav.* 44: 63–68.

Singer TL (1998). Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Am. Zool.* 38: 394-405.

Vander Meer RK, Breed MD, Winston ML and Espelie EK (1998). Pheromone communication in social insects. Westview, Boulder.

Wille A and Michener CD (1973). The nest architecture of stingless bees with special reference to those of Costa Rica (Hymenoptera, Apidae). *Revista de Biologia Tropical* 21: 1-278.

Wilson EO (1971). The insect societies. Cambridge, Harvard University Press, Massachusetts.

Table 1. Mean area percentage of the peaks ($\pm$ standard deviation) of the cuticular hydrocarbons of *Schwarziana quadripunctata*.

Ret. Time	Compound	Colony A						Colony B					
		Young workers		Old workers		Gynes		Young workers		Old workers		Gynes	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
13,12	Nonadecane (C19)	6,30 $\pm$ 2,09		0,20 $\pm$ 0,14		0,75 $\pm$ 0,51		3,14 $\pm$ 1,56		0,70 $\pm$ 0,77		0,41 $\pm$ 0,24	
15,82	Eicosane (C20)	0,39 $\pm$ 0,15		0,07 $\pm$ 0,05		0,13 $\pm$ 0,06		0,24 $\pm$ 0,09		0,07 $\pm$ 0,03		0,04 $\pm$ 0,03	
18,64	Heneicosane (C21)	2,21 $\pm$ 0,61		0,19 $\pm$ 0,09		0,36 $\pm$ 0,21		1,89 $\pm$ 0,61		0,35 $\pm$ 0,35		0,21 $\pm$ 0,15	
21,40	Docosane (C22)	0,34 $\pm$ 0,08		0,06 $\pm$ 0,01		0,48 $\pm$ 1,06		0,25 $\pm$ 0,07		0,07 $\pm$ 0,04		0,04 $\pm$ 0,03	
22,10	Octadecanal	0,15 $\pm$ 0,00		0,27 $\pm$ 0,17		0,06 $\pm$ 0,02		0,06 $\pm$ 0,01		0,17 $\pm$ 0,11		0,06 $\pm$ 0,04	
23,35	1-Tricosene	0,81 $\pm$ 0,24		0,04 $\pm$ 0,01		0,20 $\pm$ 0,08		0,66 $\pm$ 0,21		0,13 $\pm$ 0,11		0,10 $\pm$ 0,06	
23,55	9-Tricosene	0,23 $\pm$ 0,07		0,12 $\pm$ 0,04		0,21 $\pm$ 0,28		0,40 $\pm$ 0,11		0,15 $\pm$ 0,10		0,08 $\pm$ 0,04	
24,15	Tricosane (C23)	13,49 $\pm$ 4,02		4,62 $\pm$ 2,23		6,73 $\pm$ 6,05		12,67 $\pm$ 1,85		6,76 $\pm$ 2,97		3,17 $\pm$ 1,41	
25,05	5-Methyltricosane	1,34 $\pm$ 0,36		-		0,30 $\pm$ 0,15		1,32 $\pm$ 0,35		0,40 $\pm$ 0,00		0,21 $\pm$ 0,18	
26,05	3-Methyltricosane	0,32 $\pm$ 0,12		0,10 $\pm$ 0,04		0,15 $\pm$ 0,08		0,32 $\pm$ 0,08		0,15 $\pm$ 0,02		0,07 $\pm$ 0,07	
26,70	Tetracosane (C24)	0,82 $\pm$ 0,24		0,23 $\pm$ 0,15		0,51 $\pm$ 0,15		0,81 $\pm$ 0,07		0,64 $\pm$ 0,10		0,39 $\pm$ 0,15	
28,65	9-Pentacosene	1,08 $\pm$ 0,33		0,48 $\pm$ 0,45		0,32 $\pm$ 0,18		0,42 $\pm$ 0,16		1,25 $\pm$ 0,83		0,09 $\pm$ 0,06	
28,86	7-Pentacosene	0,30 $\pm$ 0,10		0,32 $\pm$ 0,23		0,23 $\pm$ 0,33		0,39 $\pm$ 0,09		0,44 $\pm$ 0,42		0,13 $\pm$ 0,06	
29,38	Pentacosane (C25)	17,86 $\pm$ 4,61		13,85 $\pm$ 9,05		23,17 $\pm$ 3,70		18,42 $\pm$ 0,00		21,50 $\pm$ 8,10		20,93 $\pm$ 3,53	
30,20	11 and 13-Methylpentacosene	3,35 $\pm$ 0,79		0,09 $\pm$ 0,04		1,15 $\pm$ 0,60		2,27 $\pm$ 0,57		0,34 $\pm$ 0,46		0,61 $\pm$ 0,50	
31,95	Hexacosane (C26)	1,00 $\pm$ 0,59		1,54 $\pm$ 0,43		3,07 $\pm$ 0,65		2,13 $\pm$ 0,37		2,11 $\pm$ 0,60		3,33 $\pm$ 0,43	
33,66	9-Heptacosene	0,44 $\pm$ 0,07		0,76 $\pm$ 0,89		0,27 $\pm$ 0,19		0,02 $\pm$ 0,00		0,11 $\pm$ 0,06		-	
33,75	7-Heptacosene	0,44 $\pm$ 0,07		1,62 $\pm$ 1,59		0,45 $\pm$ 0,41		0,17 $\pm$ 0,03		2,39 $\pm$ 2,43		0,06 $\pm$ 0,04	
33,95	Z-Heptacosene	0,40 $\pm$ 0,09		2,37 $\pm$ 2,57		0,60 $\pm$ 0,57		0,58 $\pm$ 0,08		2,77 $\pm$ 3,34		0,37 $\pm$ 0,11	
34,40	Heptacosane (C27)	14,52 $\pm$ 1,95		38,38 $\pm$ 5,20		39,22 $\pm$ 9,22		25,71 $\pm$ 5,82		34,87 $\pm$ 1,80		45,15 $\pm$ 3,41	
35,10	9 and 11 and 13 and 15-Methylheptacosane	3,97 $\pm$ 0,66		0,38 $\pm$ 0,22		2,30 $\pm$ 0,84		2,97 $\pm$ 0,38		1,04 $\pm$ 1,08		1,58 $\pm$ 0,56	
36,06	3-Methylheptacosane	3,33 $\pm$ 2,82		0,23 $\pm$ 0,08		0,28 $\pm$ 0,26		0,19 $\pm$ 0,02		0,21 $\pm$ 0,19		0,35 $\pm$ 0,32	
36,75	Octacosane (C28)	0,49 $\pm$ 0,31		0,54 $\pm$ 0,18		0,82 $\pm$ 0,20		0,39 $\pm$ 0,10		0,57 $\pm$ 0,17		1,08 $\pm$ 0,21	
38,20	9-Nonacosene	0,06 $\pm$ 0,00		1,49 $\pm$ 1,01		0,17 $\pm$ 0,12		0,11 $\pm$ 0,05		0,50 $\pm$ 0,48		0,29 $\pm$ 0,20	
38,50	7-Nonacosene	0,44 $\pm$ 0,16		2,73 $\pm$ 3,48		0,24 $\pm$ 0,16		0,22 $\pm$ 0,05		3,86 $\pm$ 3,67		0,22 $\pm$ 0,18	
39,05	Nonacosane (C29)	4,00 $\pm$ 2,55		7,28 $\pm$ 4,25		4,67 $\pm$ 1,01		2,68 $\pm$ 0,69		4,69 $\pm$ 1,80		5,77 $\pm$ 1,66	
40,21	11,15 and 13,9 and 13,17-diMethylnonacosane	1,11 $\pm$ 0,17		0,10 $\pm$ 0,05		0,92 $\pm$ 1,32		0,56 $\pm$ 0,12		0,20 $\pm$ 0,22		0,36 $\pm$ 0,12	
40,60	3-Methylnonacosane	3,39 $\pm$ 2,20		0,16 $\pm$ 0,10		1,70 $\pm$ 1,87		0,04 $\pm$ 0,00		0,06 $\pm$ 0,02		0,39 $\pm$ 0,58	
42,25	Z-Hentriacontene	-		0,19 $\pm$ 0,13		0,01 $\pm$ 0,00		-		0,04 $\pm$ 0,01		0,02 $\pm$ 0,01	
42,86	9-Hentriacontene	-		3,64 $\pm$ 1,88		0,34 $\pm$ 0,21		0,24 $\pm$ 0,12		1,13 $\pm$ 1,28		0,57 $\pm$ 0,44	
43,06	7-Hentriacontene	-		0,84 $\pm$ 1,03		0,10 $\pm$ 0,06		0,09 $\pm$ 0,03		0,41 $\pm$ 0,54		0,23 $\pm$ 0,17	
43,38	Hentriacontane (C31)	0,69 $\pm$ 0,70		1,14 $\pm$ 1,07		0,37 $\pm$ 0,17		0,47 $\pm$ 0,43		0,38 $\pm$ 0,24		0,46 $\pm$ 0,31	
44,00	11 and 13 and 15-Methylhentriacontane	6,94 $\pm$ 3,64		0,73 $\pm$ 0,39		1,49 $\pm$ 0,58		1,63 $\pm$ 0,12		1,15 $\pm$ 1,17		2,01 $\pm$ 0,48	
44,50	13,17-diMethylhentriacontane	0,51 $\pm$ 0,15		0,14 -		0,35 $\pm$ 0,20		0,30 $\pm$ 0,07		0,11 $\pm$ 0,11		0,27 $\pm$ 0,04	
47,50	Tritriacontane (C33)	-		1,24 $\pm$ 0,95		0,22 $\pm$ 0,18		0,03 $\pm$ 0,01		0,51 $\pm$ 0,84		0,33 $\pm$ 0,37	

Table 2. Result of discriminant analyses for two colonies of *Schwarziana quadripunctata*. YW, young workers, OW, old workers and VQ, virgin queens.

Colony			Mahalanobis Distance	F-values	p-level
A		B			
YW	X	YW	77.97	6.55	<0.01
YW	X	OW	56.69	4.00	0.02
YW	X	VQ	106.66	7.53	<0.01
OW	X	YW	61.90	6.83	<0.01
OW	X	OW	59.12	5.22	0.01
OW	X	VQ	142.92	12.61	<0.01
VQ	X	YW	79.71	13.68	<0.01
VQ	X	OW	27.49	3.40	0.04
VQ	X	VQ	59.21	7.31	<0.01
Colony B					
YW	X	OW	67.89	7.49	<0.01
YW	X	VQ	194.74	21.48	<0.01
OW	X	VQ	99.73	8.80	<0.01
Colony A					
YW	X	OW	94.84	6.69	<0.01
YW	X	VQ	50.92	4.66	0.02
OW	X	VQ	37.05	4.58	0.02

Figure 1. Plot of the first versus the second roots of the canonical analysis. YW, young workers, OW, old workers and VQ, virgin queens.