UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Determinantes bionômicos e eco-químicos do cleptoparasitismo de *Lestrimelitta limao* Smith (Hymenoptera: Apidae, Meliponini)

Lucas Garcia von Zuben

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Determinantes bionômicos e eco-químicos do cleptoparasitismo de *Lestrimelitta limao* Smith (Hymenoptera: Apidae, Meliponini)

Lucas Garcia von Zuben

Aluno

Dr. Túlio Marcos Nunes

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

2012

Agradeço,

À Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, em especial ao programa de pós-graduação em Entomologia, por ser responsável pela minha formação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento deste trabalho;

Ao Dr. Túlio Nunes, pela orientação, pelas conversas e pela amizade, que foram fundamentais para que este trabalho acontecesse;

Ao grande biólogo Sidnei Mateus, cujas digitais estão, sem dúvida alguma, presentes neste trabalho;

Ao Prof. Ronaldo Zucchi e ao Prof. Fábio Santos do Nascimento, pelo apoio fundamental para realização deste trabalho;

Aos meus pais, Adriana e Marcos, e aos meus irmãos, Mari, Vitor, Carol e Dante, por serem parte de mim;

Aos amigos que direta ou indiretamente me ajudaram durante esses anos de desenvolvimento do mestrado, principalmente àqueles da Faruska, Kalakuta e agregados e aos da 43ª turma da Bio;

À Rafa, minha linda, pelo carinho, apoio e por ser essa mulher incrível;

Ao Dirk Louis e Stefan Jarau pela ajuda com a dissecção das glândulas;

À todos colegas de laboratório, por terem participado direta ou indiretamente na realização deste trabalho, e, especialmente, à Maria Juliana, que sempre ofereceu importante ajuda durante todo o mestrado;

À Patrícia e à Prof. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca por cederem a estufa utilizada nos experimentos;

Ao Prof. Giuliano e ao Artur pela ajuda com a síntese dos compostos;

Ao Prof. David Morgan pela ajuda na identificação dos compostos;

Ao Prof. José Maurício Bento e à Arodi, pela ajuda com os testes realizados no eletroantenograma;

“Se procurar bem você acaba encontrando.

Não a explicação (duvidosa) da vida,

Mas a poesia (inexplicável) da vida.”

Carlos Drummond de Andrade

Ao Dr. Túlio Nunes, pela orientação e amizade,

fundamentais para minha formação científica,

Dedico

Resumo

As relações entre flores e abelhas durante a evolução tiveram um importante papel na adaptação desses insetos, uma vez que eles se utilizam dos recursos florais (néctar e pólen) para sua alimentação. A adaptação a essa estratégia alimentar fica evidente pela presença de estruturas morfológicas nessas abelhas relacionadas à esse comportamento, como a corbícula. Apesar da utilização de recursos florais estar presente em praticamente todas as espécies de abelhas, algumas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) apresentam um tipo de comportamento alimentar que difere bastante de todos os outros encontrados em abelhas sociais. No comportamento conhecido como cleptoparasita, as abelhas não visitam flores e conseguem seu alimento através do saque a outras colônias. Este comportamento está presente como estratégia exclusiva nos gêneros *Lestrimelitta* e *Cleptotrigona.* Durante o saque são levados da colônia pilhada, mel, pólen, cerúmen e, principalmente, alimento larval. Apesar de alguns estudos já terem sido realizados, muitas questões importantes relacionadas à ecologia química e comportamental do cleptoparasitismo ainda permaneciam sem respostas. Sendo assim, o presente estudo objetivou investigar esses dois aspectos do cleptoparasistismo em *L. limao.* Dentro do aspecto comportamental as análises se concentraram na investigação da escolha das colônias hospedeiras. As análises eco-quimícas, por sua vez, focaram na identificação dos compostos presentes nas glândulas mandibular e salivar cefálica e na identificação do papel ecológico desses compostos durante os saques.

Os resultados obtidos trouxeram novas e importantes informações sobre o comportamento cleptoparasita de *L. limao.* Foi possível observar uma menor frequência dos ataques à espécie que apresenta respostas agressivas ao saque, em comparação às que agem passivamente. Além disso, os dados obtidos nas análises químicas trouxeram novidades importantes, relacionadas à proporção dos isômeros do citral presente na

glândula mandibular das operárias, à presença de ésteres na glândula salivar cefálica e ao papel ecológico do citral. Ainda, a evolução do cleptoparasitismo em abelhas sem ferrão é amplamente discutida e, por fim, é explicitada a necessidade de uma nova classificação para os diferentes tipos de parasitismo presentes no grupo das abelhas.

Abstract

The interactions between flowers and bees played an important role in the behavioral evolution of these insects since they feed on floral resources. Nevertheless, some species of stingless bees have a different feeding strategy, which is known as cleptoparasitism. These species obtain their food exclusively through pillaging of other beehives. The exclusivity of this stealing behavior can be found in two different groups of stingless bees, *Lestrimelitta and Cleptotrigona*. Although some studies concerning this interesting behaviour have already been made, there are many questions related to its chemical and behavioral ecology that remain virtually unknown. Thus, the aim of this study was to investigate these aspects of the cleptoparasitism in *Lestrimelitta limao.* The behavioral analyses focused on the investigation of host choice by the cleptoparasitic bees while eco-chemical analyses investigated the chemical profile of the cephalic glands (mandibular and cephalic salivary) and their ecological role during the pillage.

The results brought new important information concerning the cleptoparasitic behavior of L. limao. The host choice analysis indicates a lower frequency of attacks in the aggressive hosts. Chemical investigations showed different proportions of the citral's isomers which are present in the mandibular gland, the chemical profile of cephalic salivary glands and the ecological role of citral. Furthermore, the evolution of cleptoparasitic behaviour is widely discussed and the necessity of a new classification for the parasitism among bees is presented.

Índice

Introdução.....1

Materiais e Métodos.....10

Resultados.....19

Discussão.....36

Bibliografia.....57

Apêndices.....63

1. Introdução

As abelhas sociais (Apidae: Hymenoptera) constituem um importante grupo de insetos e chamam a atenção pela alta complexidade de sua organização social. Essa organização constitui a característica principal desses animais e evoluiu a partir da seleção de fatores ecológicos e sociais (Ross & Keller, 1995). Um dos fatores ecológicos essenciais para a adaptação desses animais é o modo pelo qual eles conseguem seu alimento. Essa atividade, de fundamental importância para sua reprodução e sobrevivência, influenciou a evolução de caracteres morfológicos, fisiológicos e comportamentais nesses insetos (Roubik, 1989). Além disso, esses animais, considerados o mais importante grupo de polinizadores modernos, tiveram um papel fundamental na diversificação das angiospermas (Grimaldi & Engel, 2005).

De maneira geral, as abelhas sociais obtêm seu alimento através da utilização de recursos florais (pólen e néctar). O pólen constitui a principal fonte de proteína e o néctar a principal fonte de carboidratos (Michener, 1974; Roubik, 1989). As operárias possuem especializações anatômicas que permitem o transporte do néctar e do pólen para a colônia, sendo o pólen transportado por meio de uma estrutura especializada, localizada no par de pernas posterior desses indivíduos, chamada de corbícula (Wilson, 1971, Michener, 1974). Esses nutrientes são coletados em excesso pelas operárias e todo alimento coletado além das necessidades imediatas de um indivíduo é utilizado para alimentação das larvas ou armazenado para uso futuro em potes de alimento localizados dentro da colônia (Michener, 1974). Embora esses dois recursos sejam aqueles coletados com maior frequência pelas operárias, outros recursos, como a seiva e a resina das plantas, também são utilizados pelas abelhas (Roubik, 1989). Além disso, algumas espécies (e.g. *Trigona hypogea*) utilizam como fonte proteica carne de animais mortos, ao invés do pólen. Há, também, espécies que coletam fezes de outros animais, que podem ser armazenadas ou utilizadas na construção do ninho (Roubik, 1989).

Um importante aspecto do comportamento alimentar das abelhas sociais é a existência de uma eficiente comunicação entre as operárias de uma colônia, o que auxilia na localização e no recrutamento para fontes de alimento. O modo pelo qual as forrageadoras comunicam e recrutam as outras operárias para uma determinada fonte de alimento varia entre os diferentes grupos de abelhas sociais. No gênero *Apis*, a comunicação e o recrutamento ocorrem, principalmente, através de uma dança ("waggle dance") realizada pelas operárias dentro da colônia, enquanto em Meliponini a utilização de trilhas químicas, marcação química da fonte de alimento e comunicação sonora constituem as principais formas de sinalização de uma fonte de alimento (*rev.*, Barth *et al.*, 2008)

Apesar das interações com flores estarem presentes em quase todos os grupos de abelhas, em abelhas sem ferrão (Meliponini), grupo grande de abelhas eussociais de ampla distribuição geográfica, existem outros tipos de interações ecológicas que diferem bastante do padrão observado nas demais abelhas. Nesse grupo, além das abelhas necrófagas, que utilizam a carne de animais mortos como fonte proteica, dois gêneros são formados por espécies de abelhas parasitas altamente especializadas, as quais não visitam flores e conseguem seu alimento, obrigatoriamente, através do saque a outras colônias (Michener, 1974; Sakagami *et al.*, 1993; Sakagami & Laroca, 1963; Nogueira Neto, 1970). Este comportamento está presente nos Meliponini tropicais do gênero *Lestrimelitta* e no gênero africano *Cleptotrigona* e é chamado de comportamento cleptoparasita (Michener, 1974; Sakagami *et al.* 1993).

O cleptoparasitismo é definido tanto pelo roubo de alimento que está na posse do hospedeiro como pelo roubo do alimento sobre o qual o hospedeiro despendeu grande quantidade de energia para conquistar (Iyengar, 2008). Ao longo da evolução, este interessante tipo de comportamento se desenvolveu entre os diferentes grupos de

animais e está presente em cnidários, platelmintos, artrópodes, moluscos, equinodermos e cordados (Iyengar, 2008).

Em insetos sociais, esse comportamento já foi descrito para formigas (Holldobler, 1986; Richard *et al.*, 2004; Breed *et al.*., 2012) e abelhas (Michener, 1974 Sakagami *et al.*, 1993; Breed *et al.*, 2012). Em formigas são encontrados apenas breves descrições sobre o saque que ocorre diretamente das forrageadoras quando estas retornam para a colônia. O tipo de alimento roubado varia entre as diferentes espécies nas quais o comportamento cleptoparasita é observado. A espécie *Crematogaster limata* rouba apenas pequenas quantidades de líquidos florais, enquanto o alimento roubado pelas operárias de *Myrmecocystus mimicus* são os insetos capturados pelas forrageadoras da espécie hospedeira. Além disso, em nenhuma dessas espécies esse tipo de comportamento é obrigatório (Holldobler, 1986; Richard *et al.*, 2004).

O gênero *Lestrimelitta*, grupo cleptoparasita de abelhas sem ferrão mais estudado, é formado por 19 espécies e está presente desde o México até o Sul do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (Schwarz, 1948; Roubik ,1980; Camargo & Moure 1989; Ayala, 1990 e Oliveira & Marchi, 2005; Moure *et al.*, 2007). As abelhas deste gênero não possuem corbícula funcional, não visitam flores e conseguem seus alimentos através da pilhagem de outras colônias (Sakagami & Laroca, 1963; Michener, 1974; Sakagami *et al.* 1993). Embora o comportamento de pilhagem de outras colônias possa ocorrer facultativamente em algumas outras espécies de abelhas sem ferrão dos gêneros *Oxytrigona*, *Scaptotrigona* e *Melipona*, as espécies cleptoparasitas do gênero *Lestrimelitta* apresentam especializações anatômicas, ecológicas e comportamentais relacionadas ao saque de outras colônias. Além disso, essas abelhas nunca foram observadas coletando pólen e néctar de flores. Desse modo, as abelhas deste gênero são consideradas cleptoparasitas obrigatórias, ou seja, sua única forma de obtenção de alimento é através do saque (Nogueira Neto, 1970; Sakagami *et al.*, 1993).

Segundo Sakagami *et al.* (1993), o ataque à colônia hospedeira se inicia com a chegada de vários indivíduos de *Lestrimelitta* à colônia que vai ser atacada, nesse momento, um forte cheiro de limão é liberado pelas abelhas invasoras. Simultaneamente, a entrada da colônia hospedeira é dominada pelas operárias de *L. limao*, que agressivamente impedem que as forrageadoras da colônia atacada retornem (Nogueira Neto, 1970; Sakagami *et al.*, 1993). Além disso, as abelhas saqueadoras depositam cerume na entrada do ninho da colônia atacada e, algumas vezes, constroem uma entrada do ninho semelhante à entrada de seu ninho (Sakagami & Laroca, 1963; Nogueira Neto, 1970; Sakagami *et al.*, 1993). Algumas operárias da colônia hospedeira, presentes na colônia no momento do ataque, ao tentar defender a colônia, são atacadas e recuam para dentro da colônia, ou então são mortas pelas abelhas invasoras. Dentro do ninho, as operárias de *Lestrimelitta limao* iniciam o saque e levam da colônia hospedeira mel, pólen, materiais do ninho e, principalmente, alimento larval (Sakagami *et al.*, 1993). O saque é finalizado com a partida gradual de operárias de *L. limao* e a chegada também gradual de operárias da colônia hospedeira, que estavam fora do ninho no momento do ataque. Esse processo acontece até que todas as saqueadoras tenham se retirado da colônia atacada (Sakagami *et al.*, 1993). As operárias das espécies hospedeiras podem reagir de dois modos diferentes aos ataques, podendo 1) recuar para dentro da colônia e permanecer imóvel entre as células de cria até que o ataque termine (Sakagami *et al.*, 1993); ou 2) reagir agressivamente, atacando fortemente as abelhas invasoras (Wittmann, 1990).

Na maioria dos casos o ataque tem duração de cerca de quatro horas em um único dia, mas pode continuar por até 34 dias (Sakagami *et al.* 1993). O intervalo entre um saque e outro é de cerca de 2 meses, embora esse período apresente uma grande variação. (Sakagami & Laroca, 1963; Sakagami *et al.* 1993). A recuperação de uma colônia hospedeira após um ataque varia bastante, sendo que algumas colônias podem

receber ataques frequentes sem serem extintas, enquanto para outras espécies um único ataque pode resultar no fim da colônia atacada (Sakagami & Laroca, 1963).

Quando analisado sob uma perspectiva ecológica, a utilização de colônias de outras espécies como recurso alimentar, ao invés de flores, possui consequências importantes. A mais importante delas se refere às interações ecológicas relacionadas a cada estratégia alimentar. Enquanto a interação com as plantas é de cooperação, visto que tanto as plantas como as abelhas são beneficiadas, a interação com outras colônias é de competição e disputa direta por recurso. Isso tem como resultado a existência de características únicas nessa espécie cleptoparasita.

Um importante aspecto desse comportamento está relacionado à comunicação realizada pelas operárias. Além da existência de uma comunicação intraespecífica, que coordene todo o ataque, transmitindo informações sobre o seu início e término e sobre a localização da fonte alimentar, deve existir também uma comunicação interespecífica, que funcionaria como uma "arma química" atuando no recuo das abelhas atacadas, ou atrapalhando sua comunicação de defesa, facilitando, assim, o saque (Blum, 1970; Nogueira Neto, 1970, Wittmann, 1990; Pompeu & Silveira, 2005; van Zweden *et al.*, 2011).

Segundo os estudos realizados, o principal composto utilizado por essas abelhas durante o ataque a outras colônias seria aquele responsável pelo forte cheiro de limão liberado pelas invasoras. Esse composto é secretado pelas glândulas mandibulares de operárias de *Lestrimelitta limao* e é formado por dois compostos isômeros, geranial e neral, conhecidos como *cis*- e *trans*-citral (Blum, 1966; Blum *et al.*, 1970). Os estudos já realizados sugerem uma variedade de funções para este composto: 1) atuar na repelência das operárias atacadas (Kerr, 1951; Moure *et al.*, 1958); 2) atrair as demais operárias saqueadoras para a colônia hospedeira (Kerr, 1951; Moure *et al.*, 1958); 3) atrapalhar a comunicação defensiva das abelhas hospedeiras (Kerr, 1951; Moure *et al.*,

1958); e 4) atuar como um sinal de início e término dos saques (Sakagami *et. al.*, 1993),. No entanto, existem divergências sobre suas possíveis funções. Sakagami *et al.*, (1993) e Nogueira Neto (1970) sugerem que esse composto não deve ter uma função repelente, uma vez que essa substância provoca diferentes respostas em diferentes espécies e em diferentes momentos, podendo, inclusive, atrair outras espécies ao invés de afastá-las. Assim, esses autores propõem que o citral pode provocar várias respostas de acordo com a sua concentração e que se esse composto oferece alguma vantagem à *L. limao*, não é sua função repelente. Apesar disso, apoiam a hipótese desse composto atuar como uma trilha química para os outros indivíduos dessa espécie.

Embora a utilização do citral no estabelecimento da trilha química de comunicação também tenha sido descrita para abelhas do gênero *Geotrigona* (Blum *et al.*, 1970), estudos recentes refutaram a hipótese de que os compostos liberados pelas glândulas mandibulares, como o citral, estão presentes nas trilhas químicas utilizadas pelas abelhas sem ferrão, sendo um conjunto de ésteres liberados pelas glândulas salivares cefálicas os principais componentes dessas trilhas (Jarau *et al.*, 2006; Schorkopf *et al.*, 2007; Stangler *et al.*, 2009).

Desse modo, as informações existentes sobre o papel ecológico do citral em *L. limao* não estão claras. Além disso, para se determinar a função desse composto os estudos citados utilizaram apenas amostras de citral sintético para os testes comportamentais, e não de extratos glandulares puros, o que pode trazer imprecisões nas respostas obtidas. Ainda, essas informações obtidas recentemente sobre o papel dos compostos presentes nas glândulas salivar cefálica no comportamento de forrageio de diversas espécies de abelhas sem ferrão, torna necessária uma investigação da função dos compostos secretados por essa glândula também nessa espécie cleptoparasita. Sendo assim, o conhecimento sobre a comunicação química dos saques de *L. limao* ainda possui diversas lacunas que precisam ser preenchidas.

Outra importante questão sobre o comportamento cleptoparasita dessas abelhas sociais está relacionada à escolha da espécie hospedeira. Embora a maioria das espécies de abelhas sem ferrão não ofereça muita resistência aos ataques de *L. limao,* algumas outras, como a *Tetragonisca angustula*, reagem muito agressivamente, atacando fortemente as abelhas saqueadoras (Wittmann, 1985; Wittmann *et al.*, 1990). No combate entre as duas espécies, vários indivíduos das duas colônias morrem, sendo a maioria desses indivíduos operárias da colônia atacada (Sakagami & Laroca, 1963). O sucesso de um ataque é fundamental para que esse tipo de comportamento exista e a perda de inúmeros indivíduos pode ter um alto custo para as colônias de *L. limao.* Assim, considerando a resposta diferencial de algumas espécies ao ataque de *L. limao*, é esperado que, nessa espécie cleptoparasita, algum tipo de escolha dos ninhos a serem atacados tenha sido selecionada ao longo da evolução desse comportamento.

Estudos apontam que algumas espécies foram atacadas mais vezes por *L. limao* em um determinado período (Bego *et al.*,1991; Sakagami *et al.* 1993). No entanto, essas espécies eram também as que possuíam maior densidade de colônias na área estudada. Desse modo, é possível que o maior número de ataques observados nesses estudos esteja relacionado com a maior densidade de colônias no local. O estudo de saques em condições nas quais as quantidades de colônias hospedeiras sejam iguais deve fornecer informações mais precisas a respeito da escolha de hospedeiros em *L. limao.*

Sendo assim, embora alguns estudos sobre o comportamento cleptoparasita em abelhas sem ferrão já tenham sido realizados, as informações ainda são imprecisas, escassas e com lacunas, deixando, assim, importantes aspectos ecológicos e comportamentais dessas abelhas necessitando de uma análise robusta. O presente trabalho teve, portanto, o objetivo de investigar aspectos ainda desconhecidos do cleptoparasitismo em *L. limao.* Assim, as análises se dividiram em duas vertentes, uma eco-química e outra comportamental.

A primeira delas se concentrou em analisar aspectos da comunicação química dessa espécie. Para tanto, as glândulas mandibulares e labiais das operárias foram dissecadas e tiveram seu conteúdo analisado. A segunda vertente avaliou a existência de escolha da colônia hospedeira pelas operárias de *L. limao*. O trabalho discute, ainda, possíveis explicações para evolução do comportamento cleptoparasita em abelhas sem ferrão. Por fim, é explicitada a necessidade de uma nova classificação dos diferentes tipos de parasitismo existentes no grupo das abelhas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material biológico

Foram utilizadas três colônias de *Lestrimelitta limao* além de colônias de outras três espécies de abelhas sem ferrão: *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Frieseomelitta varia*. A primeira espécie é vítima conhecida dessa espécie cleptoparasita (Sakagami *et al.*, 1993), enquanto *T. angustula* apresenta forte resistência aos seus ataques (Wittmann, 1985; Wittmann *et al.*, 1990) e, em *F. varia*, não existiam registros de ataques. Todas as colônias foram acondicionadas em caixas de madeira (20x20x12cm) apropriadas para observação.

2.2. Análises comportamentais

2.2.1. Local de estudo e aparato experimental

Os estudos foram realizados em uma casa de vegetação montada no campus da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. A casa de vegetação possui 6,4m x 9m (área = 57,6m^2) e altura de 3,5m (Figura 1). A cobertura é de filme de polietileno transparente com espessura de 150 micras e as laterais fechadas com tela de sombreamento (malha para 50%), ambos com tratamento contra raios ultravioleta. O estudo em casas de vegetação se fez necessário uma vez que é fundamental na análise da escolha da colônia hospedeira controlar quais colônias estarão disponíveis para o ataque das operárias de *L. limao*, o que é impossível em ambientes abertos. A boa adaptação das abelhas sem ferrão a esses ambientes fechados já foi demonstrada por diversos estudos (Roselino, 2005; Santos *et al.*, 2008; Roselino *et al.*, 2009 e Santos *et al.*, 2009). Além dos ninhos, foi colocada dentro da casa de vegetação uma variedade de plantas, como manjericão (*Ocimum basilicum*) e o cosmos-amarelo (*Bidens sulphurea*), para que as operárias das espécies não saqueadoras pudessem forragear. Foram colocados também alimentadores com xarope (50%, v/v) para fornecer uma fonte de alimento adicional a estas espécies.

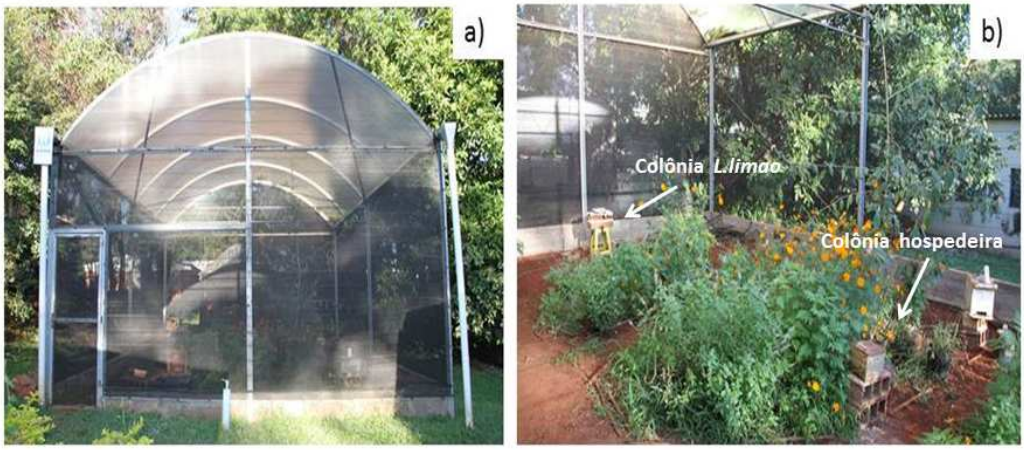


Figura1. Casa de vegetação onde os experimentos foram realizados. a) Visão externa; b) Visão interna.

2.2.2. Testes de preferência por espécie hospedeira

Em cada teste, somente uma colônia de *L. limao* foi colocada dentro da casa de vegetação com uma colônia de cada uma das outras espécies (*F. varia*, *N. testaceicornis*, *T.angustula*). As colônias hospedeiras utilizadas tinham, aproximadamente, as mesmas dimensões com relação à quantidade de alimento e indivíduos presentes nas colônias. As três colônias hospedeiras foram colocadas uma do lado da outra, no lado oposto à colônia de *L. limao*, sendo que todas ficaram igualmente distantes da colônia saqueadora (Figura 2). Durante o estudo, o comportamento das operárias de *L. limao* durante o ataque à colônia hospedeira foi acompanhado através de observações diretas, anotações de comportamentos específicos bem como o registro com câmera fotográfica. Além disso, foi avaliada a quantidade de ataques em cada colônia hospedeira. Dado que o objetivo principal foi verificar a escolha por uma determinada espécie, sempre que ocorria um ataque, as colônias experimentais, bem como as posições dos ninhos, eram alteradas. Isolando, dessa forma, fatores como a

posição do ninho e a preferência por uma colônia já atacada na análise da escolha da colônia hospedeira.

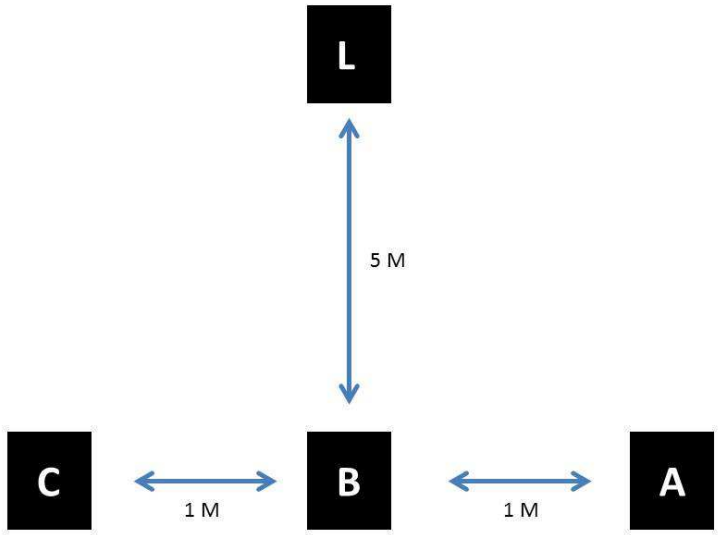


Figura 2. Esquema indicando a posição das colônias na casa de vegetação. L – Colônia de *L. limao;* A, B e C – Colônias hospedeiras.

2.3. Análises eco-químicas

2.3.1. Análises químicas dos compostos presentes nas glândulas cefálicas de L. limao

Os compostos presentes nas glândulas mandibular e salivar cefálica foram identificados por meio da análise dos extratos puros dessas glândulas. O papel dos compostos presentes na glândula mandibular durante o ataque foi avaliado através da realização de bio-ensaios com as espécies hospedeiras.

Para a preparação dos extratos das glândulas mandibular e salivar cefálica das operárias de *L. limao* foi utilizada a metodologia proposta por Stangler *et al.* (2009). Seguindo essa metodologia, os indivíduos foram congelados à -8 °C e as glândulas foram cuidadosamente dissecadas em água destilada. Para conseguir os extratos puros de uma única glândula, todos os outros tecidos foram removidos. Foram analisadas vinte glândulas de cada tipo de operárias de duas colônias diferentes.

As glândulas labiais foram dissecadas e analisadas através do método de injeção sólida (Morgan, 1990). As glândulas foram inseridas em um pequeno e fino capilar de vidro com uma das extremidades selada por aquecimento. Após a inserção da glândula, a outra extremidade do capilar foi igualmente selada com fogo. Em seguida, a amostra foi aquecida no interior do cromatógrafo por 2 minutos a uma temperatura de 150 ºC. Os capilares foram, então, quebrados e os compostos voláteis analisados pelo cromatógrafo. Foi inserida apenas uma glândula por capilar e apenas um capilar foi introduzido no GC-MS por vez. As glândulas mandibulares foram dissecadas e os seus compostos foram extraídos em 50 µl de hexano. Na preparação dos extratos glandulares, uma única glândula foi utilizada para cada amostra. Assim, foram analisadas vinte amostras de cada tipo de glândula, de duas colônias diferentes de *L. limao.* Algumas das amostras analisadas saturaram a coluna cromatográfica e, por isso, não foram utilizadas para a análise quantitativa.

Além dos extratos glandulares, foram realizados extratos da cabeça através da maceração de uma cabeça de operária de *L. limao* em 500 µl de hexano, três amostras deste extrato foram analisadas. Estes extratos cefálicos foram preparados para analisar as proporções dos isômeros do citral presente na cabeça das operárias. Dado que este composto está presente em grande concentração na cabeça desses indivíduos, foi necessário utilizar extratos cefálicos bastante diluídos para evitar a saturação da coluna do cromatógrafo. Além disso, foram analisadas amostras de citral sintético adquirido da empresa Sigma-Aldrich. Nessas análises, foram utilizados 20 µl de citral sintético diluídos em 1 ml de hexano.

Ainda, a cera depositada pelas operárias de *L. limao* nas colônias hospedeiras durante o saque foi coletada e também foi analisada com objetivo de investigar a presença dos compostos cefálicos neste material. Um pequeno pedaço dessa cera foi colocado em 0,5mL de hexano e o extrato resultante foi analisado em um sistema de GC-MS, do mesmo modo que as amostras anteriores.

2.3.3. Análises químicas

Para a quantificação e identificação das substâncias químicas das glândulas labiais e mandibulares, os extratos foram preparados conforme descrito acima, 2µl do resultado da extração com hexano foram analisados em um sistema de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas SHIMADZU, modelo GCMS-QP2010, equipado com coluna capilar de silicone de 25m e hélio como gás carreador à 1 ml/min. Posteriormente, os dados foram analisados para caracterização do espectro de massa. A área sob os picos apontados pelo cromatógrafo foi utilizada para a quantificação dos compostos encontrados, enquanto os espectros de massas obtidos pelo detector de massas foram utilizados para a identificação dos compostos representativos de cada pico através de comparações com compostos sintéticos padrões, comparação com bibliotecas

especializadas (Wiley e Nist 2003) e dados da literatura. O protocolo de temperatura utilizado foi: 60 a 320 ºC em uma taxa de 6 ºC min^{-1}, mantido a 320 ºC por 10 min. Todas as análises foram feitas em modo *splitless*.

2.3.4. Avaliação do papel do citral presente na glândula mandibular

Para avaliar o papel dos compostos presentes na glândula mandibular durante o saque de *L. limao* foram realizados testes com as espécies hospedeiras (*T. angustula e F. varia).* Foram utilizados quatro grupos experimentais nas análises: extratos de uma glândula mandibular, citral sintético em concentração equivalente a uma glândula mandibular, extratos cefálicos (controle positivo), e hexano (controle negativo). A quantificação da concentração de citral equivalente a uma glândula foi realizada através da injeção no GC-MS de concentrações conhecidas do composto sintético e a área do pico encontrada para essas concentrações foi comparada com a área do pico encontrada nos extratos de uma única glândula mandibular.

Esses compostos foram aplicados em uma pequena bola de algodão e apresentados a alguns centímetros (cerca de 2 cm) da entrada das colônias hospedeiras durante 3 minutos (Figura 3), foram utilizados 20μL de cada composto em uma amostra. As respostas das espécies hospedeiras durante esse período foram avaliadas e classificadas da seguinte maneira:

- *Agressão*: operárias agridem a fonte do composto;

- *Repelência*: operárias se afastam da fonte do composto;

- *Indiferença:* operárias não demostram nenhuma reação ao composto apresentado.

As respostas foram gravadas e, posteriormente, analisadas por uma pessoa diferente daquela que realizou os experimentos e que não sabia quais amostras estavam

sendo apresentadas. Evitando desse modo qualquer tipo de viés na análise das repostas. Foram utilizadas três colônias de cada espécie e três repetições de cada grupo experimental foram realizadas com cada colônia. As análises estatísticas foram realizadas através do Fisher Exact´s Test (α =5%).

Figura 3. Ilustração do bio-ensaio realizado com as colônias hospedeiras. Na foto, algodão contendo o composto a ser reconhecido sendo apresentado na entrada de uma colônia de *F. varia*.

2.3.5. Avaliação da presença dos compostos da glândula salivar cefálica na cera depositada pelas operárias de L. limao nas colônias hospedeiras

2.3.6. Síntese dos ésteres presentes na glândula salivar cefálica

O seguinte procedimento geral foi utilizado para a síntese dos ésteres acetato de hexadecila e acetato de 9-hexadecenila. Em um balão com agitação foram adicionados 10 mL de THF e DMAP (5mg, 0,316mmol). À mistura foi adicionado hexadecanol/hexadecenol (1 mmol) e esta foi resfriada em banho de gelo picado. Foi

adicionado, lentamente e sob agitação magnética, anidrido acético (103 uL, 1,1 mmol). A mistura foi mantida sob agitação e aquecida a 50°C em banho-maria por 2 horas. Ao término da reação foi adicionado 5 mL de solução saturada de NaHCO3. A fase orgânica foi separada, lavada com solução de NH4Cl (2x10 mL), seca com MgSO4 e o solvente removido sob rotaevaporação.

2.3.7 Análise exploratória das respostas olfativos das operárias de F. varia ao extrato da cabeça de operárias de L. limao

Para identificar quais compostos cefálicos provocam de fato uma resposta nas abelhas hospedeiras e que, portanto, devem ter algum papel na comunicação interespecífica durante o ataque, foi realizada uma análise exploratória das respostas eletrofisiológicas das antenas de operárias de *F.varia* a extratos cefálicos de operárias de *L. limao.* Essas análises foram realizadas com auxílio de um sistema de cromatografia gasosa associado a um eletroantenograma (CG- EAG). Nesse sistema, os diferentes compostos presentes em uma amostra são separados em uma coluna cromatográfica, no final da coluna existe um separador (*split*) que encaminha parte dos compostos para o detector do cromatógrafo (FID, Flame Ion Detector) e a outra parte para a antena do inseto montada sobre dois eletrodos. No contato dos compostos detectáveis pela antena do inseto, um sinal elétrico é produzido, transportado pelos eletrodos e amplificados para seu registro. Desse modo é possível saber precisamente quais compostos provocam respostas nas antenas dos insetos.

Os extratos cefálicos utilizados na análise foram obtidos através da maceração de 4 cabeças de operárias de *L. limao* em 300µL de hexano e cinco repetições foram realizadas. Em cada repetição foram utilizadas 3 antenas de operárias de *F. varia*.

3. Resultados

3.1. Aspectos comportamentais

3.1.1. Testes de preferência por espécie hospedeira

3.1.2. Adaptação aos estudos em casa de vegetação.

O estudo dentro da casa de vegetação enfrentou, no início, algumas dificuldades. De maneira geral, as potenciais espécies hospedeiras (*N. testaceicornis*, *T. angustula* e *F. varia*) se adaptaram rapidamente ao ambiente fechado, visitando as flores e o alimentador. Ao contrário das colônias hospedeiras, a colônia de *L. limao* não se adaptou rapidamente à casa de vegetação. No primeiro mês de experimento, as operárias da colônia de *L. limao* ficaram bastante inativas, sendo que poucos indivíduos saiam da colônia para forragear e a entrada da colônia permanecia parcialmente fechada durante todo o dia. Durante esse primeiro mês a colônia de *L. limao* enfraqueceu bastante e foi necessário fornecer alimento (pólen, mel e alimento larval de *F. varia*) adicional à colônia, este alimento foi colocado diretamente dentro da colônia.

Depois do primeiro mês, no entanto, a atividade da colônia mudou. As operárias começaram a ficar mais ativas e o fluxo de indivíduos entrando e saindo da colônia aumentou bastante em relação ao período anterior. Durante esse período de maior atividade, foi possível observar que grande parte das operárias que saiam da colônia tentava sair da casa de vegetação. Nenhuma delas foi vista visitando flores. Apesar da maior atividade, o primeiro ataque só ocorreu um mês após o aumento da atividade do ninho.

Após esse primeiro ataque outros saques aconteceram. No entanto, após certo tempo, cerca de seis meses, a colônia de *Lestrimelitta limao* enfraqueceu, foi atacada por formigas e morreu. Logo após, uma segunda colônia de *L. limao* foi colocada dentro da casa de vegetação. Essa colônia se adaptou mais rapidamente ao ambiente fechado que a colônia anterior e também realizou ataques, no entanto, do mesmo modo que a outra colônia, após cerca de dois meses enfraqueceu bastante. Essa colônia foi, então,

retirada da casa de vegetação para que pudesse se recuperar. Uma terceira colônia foi colocada e, do mesmo modo que a primeira, passou cerca de um mês com pouca atividade de suas operárias. Depois disso, assim como as demais colônias, realizou seu primeiro saque. A terceira colônia permaneceu na casa de vegetação até o final dos experimentos.

Os motivos que levaram ao enfraquecimento das duas primeiras colônias não puderam ser identificados com precisão. No entanto, é provável que esse enfraquecimento tenha uma relação direta com a interrupção dos saques que foi realizada para preservar os ninhos hospedeiros. O comportamento das operárias das colônias de *L. limao* durante o enfraquecimento foi bastante semelhante nos dois casos. Em um primeiro momento, a atividade de forrageio cessava completamente, nenhuma abelha saia do ninho e a entrada permanecia completamente fechada. Em seguida, a rainha parava de ovipositar e as operárias começavam a se alimentar do seu próprio alimento larval. Por fim, a consequência dessa série de comportamentos era a morte da colônia.

3.1.3. Comportamento de saque de L. limao

As características dos ataques em cada espécie permitem dividi-los em três tipos, de acordo com a resposta das operárias da colônia hospedeira. No primeiro tipo de resposta as operárias da colônia atacada não reagem agressivamente. Ao invés disso, elas consomem todo o alimento que conseguem, armazenando-o no seu papo e, depois, ficam paralisadas e agrupadas entre as células de cria durante todo o saque (Figura 4). Desse modo, as operárias cleptoparasitas não enfrentam nenhuma resistência e conseguem levar os recursos armazenados na colônia. Durante o saque, as operárias de *L. limao* levam pólen, mel, cerúmen e, principalmente, alimento larval. Além disso, as

operárias saqueadoras também construíram uma entrada do ninho semelhante a sua na entrada da colônia atacada. Esse tipo de resposta foi observado nas espécies *F. varia* e *N. testaceicornis.*

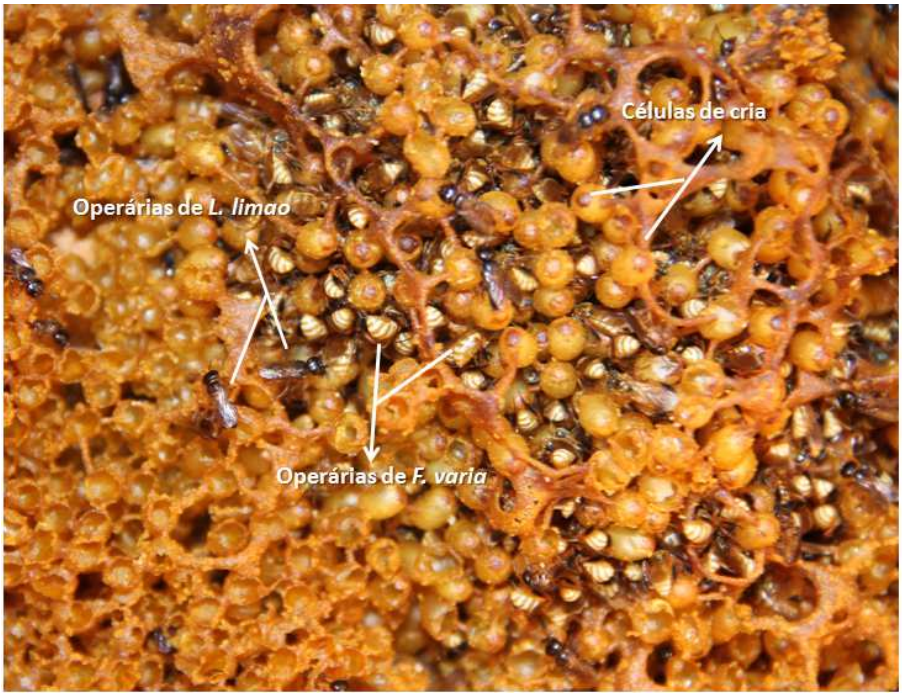


Figura 4. Foto de um ataque à uma colônia de *F. varia*, apontando operárias dessa espécie paralisadas entre as células de cria durante um ataque de *L. limao*

O segundo tipo de resposta apresentada pelas hospedeiras, presente em *T. angustula*, corresponde a uma reação bastante agressiva das operárias da colônia saqueada. Essas operárias se defendem atacando fortemente as operárias invasoras, resultando em um grande número de indivíduos mortos de ambas as espécies, invasora e hospedeira. Essa estratégia de defesa, no entanto, não é suficiente para evitar todas tentativas de saque. Nessas espécies os recursos saqueados foram os mesmos que nas outras espécies. Além disso, o ataque a *T. angustula* foi o único que resultou na morte da colônia hospedeira após o término do ataque.

Além dessas duas respostas, há, ainda, uma terceira resposta possível das operárias da colônia hospedeira, realizada pela espécie *F. varia*. Embora essa espécie não reaja agressivamente aos ataques de *L. limao*, ela possui outra estratégia de defesa de seus recursos, que consiste na deposição de grandes quantidades de resina na entrada da colônia, resultando na sua obstrução e impedindo a entrada das operárias de *L. limao* (Figura 5). Nos ataques observados nos quais houve essa deposição, as operárias saqueadoras tentaram retirar a resina da entrada, mas não obtiveram sucesso.

Figura 5. Operárias de *L. limao* retirando a resina depositada pelas operárias de *F. varia* na entrada do ninho durante uma tentativa de saque.

Além das respostas de cada espécie aos ataques das abelhas saqueadoras, outras informações relevantes puderam ser observadas e podem ser muito úteis para a análise do comportamento cleptoparasita de *L. limao*. Foi observado, por exemplo, que as operárias invasoras sempre depositavam cerúmen na colônia hospedeira (Figura 6). Este cerúmen foi coletado e colocado em uma placa de vidro um metro ao lado da colônia atacada, esta colônia, por sua vez, foi retirada da sua posição original e levada para um lugar distante, para avaliar o efeito que o cerúmen isolado tinha sobre as operárias de *L.*

limao. Foi possível observar que as operárias invasoras foram fortemente atraídas por esse material, sendo que grande parte dos indivíduos que estavam na região da colônia atacada voaram até o local onde a cera foi colocada. Foi observado também que o pólen saqueado de algumas colônias foi transportado até a colônia de *L. limao* na corbícula das operárias (Figura 7). Outro dado importante é que não foi possível sentir o cheiro de limão característico dessa espécie nem no início, nem no final do saque, como descrito por outros autores, embora em algumas ocasiões esse cheiro pudesse ser percebido durante o ataque.

Figura 6. Colônia de *F. varia* durante o ataque de *L. limao*. Seta indicando cerúmen depositado pelas operárias de *L. limao* na colônia hospedeira.

Figura 7. Operárias de *L. limao* transportando pólen de *F.varia* na corbícula durante o saque.

3.1.4. Resultados de escolha por espécie hospedeira

Após a superação das dificuldades iniciais, os ataques às colônias hospedeiras começaram a acontecer com maior frequência. Quinze ataques foram realizados pelas colônias de *Lestrimelitta limao* durante o período de estudo. Esses saques foram distribuídos da seguinte maneira entre as espécies hospedeiras: *N. testaceicornis*, 7 ataques (46,66%); *F. varia*, 5 ataques (33,33%); e *T. angustula*, 3 ataques (20%) (Tabela 1).

Tabela 1. Total de ataques de *L. limao* realizados nas espécies hospedeiras com e sem sucesso durante o período de estudo. Em parênteses porcentagem do total de ataques.

Espécies Hospedeiras	Saques com sucesso	Saques sem sucesso	Total
T. angustula	2	1	3 (20%)
N. testaceicornis	7	-	6 (46,66%)
F. varia	2	3	5 (33,33%)
Total	11	4	15

Outro dado obtido diz respeito ao sucesso dos ataques realizado por *L. limao.* Foi possível observar que nem todas tentativas de saques foram bem sucedidas. Foram considerados ataques mal sucedidos aqueles nos quais uma grande quantidade de indivíduos de *L. limao* tentou invadir uma colônia hospedeira sem conseguir, no entanto, entrar nessa colônia e levar qualquer recurso armazenado nela. Foram duas espécies que conseguiram evitar os saques, *F. varia* e *T. angustula.* Como dito anteriormente, cada uma delas utilizou diferentes estratégias de defesa da colônia. A taxa de ataques mal sucedidos foi de 33,33% em *T. angustula* e 60% em *F. varia* (Tabela 1).

3.2. Aspectos eco-químicos

3.2.1. Análise química dos compostos presentes na glândula mandibular e salivar cefálica

3.2.1.1. Glândula Mandibular

Foram encontrados em concentrações suficientes para serem detectados e identificados apenas dois compostos na glândula mandibular: o citral (neral e geranial) e um hidrocarboneto, o 9-nonacoseno (Tabela 2; Figura 8). O composto em maior concentração é o citral, correspondendo a cerca de 90% do conteúdo total da glândula (Tabela 2). Além disso, os isômeros do citral, neral [Apêndice Espectro 1] e geranial [Espectro 2], estão presentes na glândula mandibular em concentrações diferentes, em uma proporção de 19:1, sendo o geranial o composto majoritário (Tabela 3; Figura 8).

Tabela 2. Concentrações relativas dos compostos presentes na glândula mandibular de *L. limao.*

Pico	Tempo de Retenção	Composto	Colônia A (n=6) Média ± DP	Colônia B (n=7) Média ± DP
1	10,43	Neral	5,68 ± 0,83	6,14 ± 0,86
2	10,76	Geranial	89,93 ± 3,14	82,15 ± 4,21
3	34,75	9-Nonacoseno	6,04 ± 3,69	11,71 ± 4,31

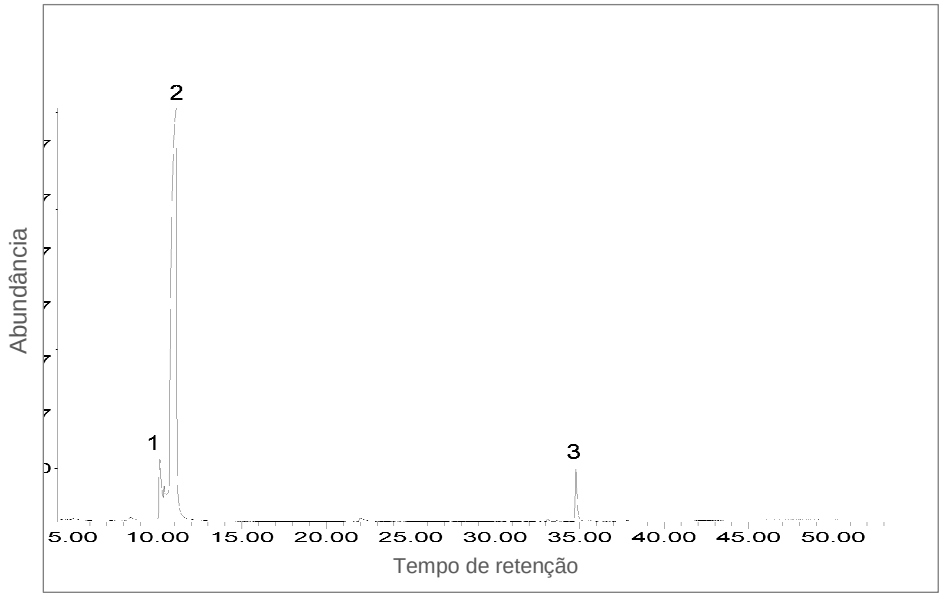


Figura 8. Cromatograma do extrato da glândula mandibular de uma operária de *L. limao*. Os números dos picos e os compostos correspondentes a cada pico estão descritos na Tabela 2.

Tabela 3. Concentrações relativas dos isômeros do citral, neral e geranial, no composto sintético e naquele presente na cabeça das operárias de *L. limao*.

Amostra	Concentração Neral	Concentração Geranial
Cabeça 1	5,52	94,48
Cabeça 2	4,16	95,84
Cabeça 3	4,2	95,8
Sintético	46,39	53,61

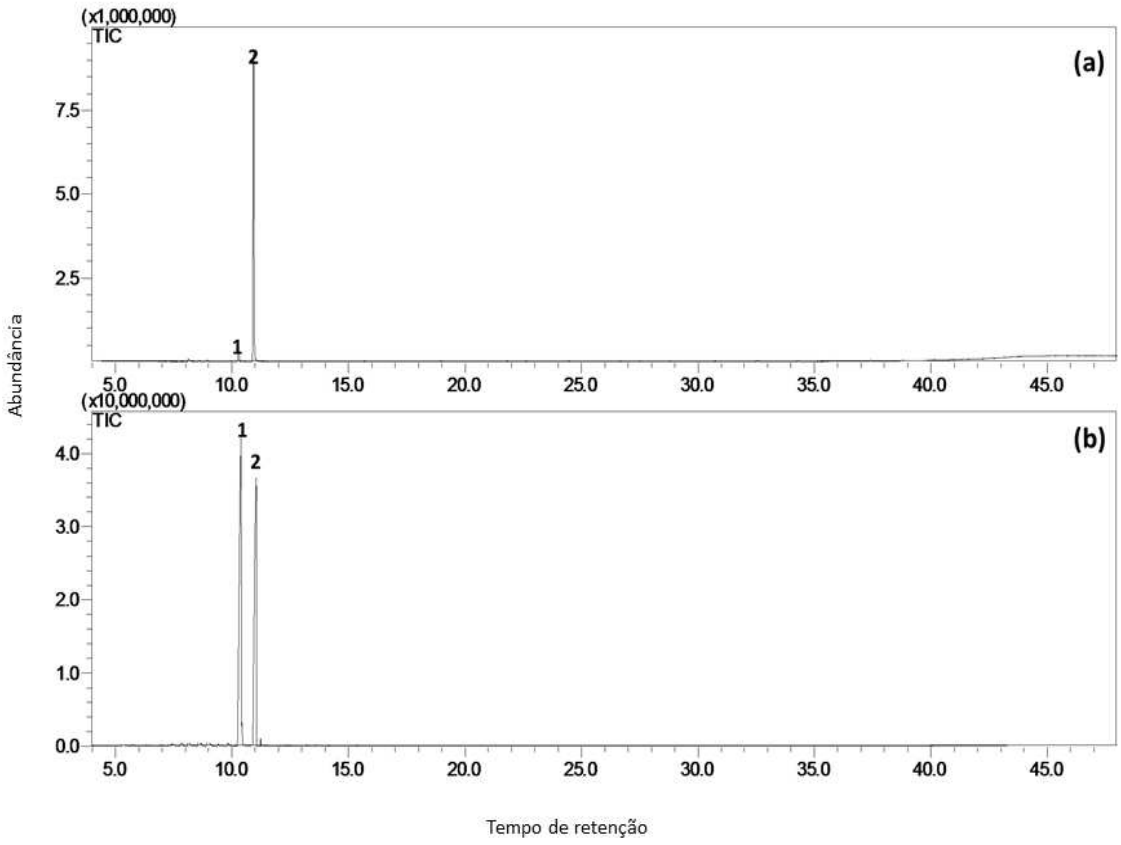


Figura 9. Cromatogramas mostrando a comparação entre o citral sintético (b) e aquele presente na glândula mandibular de uma operária de *L. limao* (a). 1 – Neral; 2 - Geranial

3.2.1.2. Glândula salivar cefálica

Na glândula salivar cefálica foram encontrados 28 compostos com concentração suficiente para serem detectados via cromatografia gasosa e identificados via espectrometria de massas (Tabela 4; Figura 10). Dentre as substâncias encontradas estão presentes ésteres, álcoois, aldeídos e ácidos carboxílicos. Os compostos majoritários são os ésteres acetato de 9-hexadecenila [Espectro 3] e acetato de hexadecila [Espectro 4], esses dois compostos juntos representam 95% de toda a concentração dos compostos encontrados no extrato da glândula salivar cefálica (Tabela 4).

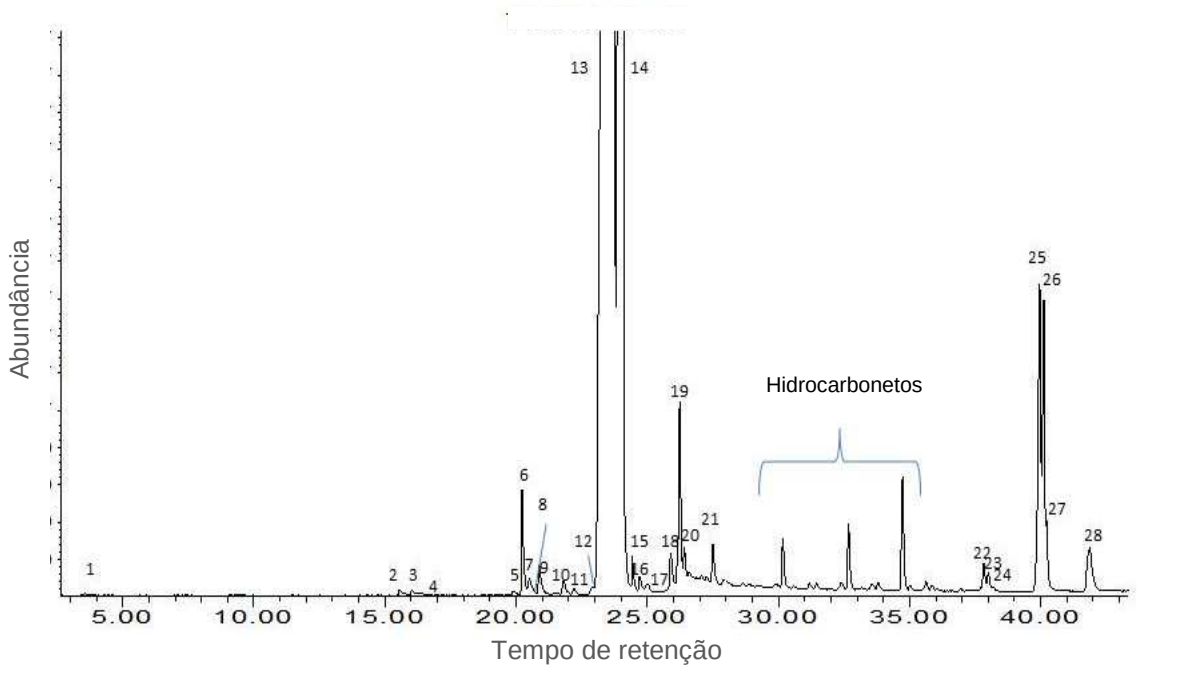


Figura 10. Cromatograma do extrato da glândula labial de uma operária de *L. limao*. Os números dos picos e os compostos correspondentes a cada pico estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações relativas dos compostos presentes na glândula salivar cefálica (n=7) de *L. limao;* Md: média; DP: desvio padrão; *traços*: compostos presentes somente em algumas amostras e em pequena concentração.

Pico	Tempo de Retenção	Composto	Md ± DP
1	3,50	Heptanal (produto de oxidação do pico 12)	*traços*
2	15,50	Hexadecenol	*traços*
3	16,00	Hexadecanol	*traços*
4	16,23	Acetoxynonanal (produto de oxidação do pico 12)	*traços*
5	19,90	Acetato de tetradecenila	*traços*
6	20,20	Acetato de tetradecila	0,34 ± 0,14
7	20,50	Hexadecenal	*traços*
8	20,64	Acetato de Farnesila	*traços*
9	20,87	Hexadecenal	1,40 ± 1,17
10	21,70	Hexadecenoato de metila	*traços*
11	22,20	Hexadecanoato de metila	*traços*
12	22,89	Hexadecenoato de etila	0,71 ± 0,61
13	23,60	Acetato de 9-hexadecenila	68,60 ± 9,44
14	24,00	Acetato de hexadecila	24,82 ± 8,34
15	24,42	Não identificado	*traços*
16	24,70	Acetato de heptadecenila	*traços*
17	24,90	Octadecenoato de metila	*traços*
18	25,90	Butirato de hexadecenila	0,59 ± 0,19
19	26,20	Acetato de Octadecenila	0,86 ± 0,10
20	26,40	Acetato de Octadecila	*traços*
21	27,49	Geranil geranil acetato	*traços*
22	37,82	Não identificado (2)	*traços*
23	38,00	Não identificado (3)	*traços*
24	38,18	Não identificado (4)	*traços*
25	40,00	Hexadecenoato de hexadecenila	4,59 ± 2,33
26	40,12	Hexadecanoato de hexadecenila	*traços*
27	40,21	Hexadecanoato de hexadecila	*traços*
28	41,8-42,0	Hexadecanoato de hexadecenila, Hexadecanoato de octadecenila, Octadecanoato de hexadecenila, Octadecanoato de octadecenila	*traços*

3.2.2. Análise de extratos cefálicos brutos

Na análise do extrato diluído da cabeça inteira de operárias de *L. limao* foram encontrados apenas quatro compostos, sendo que o composto encontrado em maior concentração foi o citral (neral e geranial), correspondendo a aproximadamente 95% do total de compostos encontrados no extrato da cabeça (Tabela 5).

Tabela 5. Concentrações relativas dos compostos encontrados em extratos diluídos da cabeça de operárias de *L. limao.* Md, média; DP, desvio padrão.

		Concentração					
Tempo de Ret.	Composto	Cabeça 1	Cabeça 2	Cabeça 3	Md	±	DP
16.185	Neral	5,02	4,08	4,12	4,4	±	0,5
17.635	Geranial	86,43	87,45	90,4	88,1	±	2,1
35.897	Acetato de 9-9-hexadecenila	3,44	0,67	1,99	2,0	±	1,4
36.058	Acetato de hexadecila	1,61	-	0,77	1,2	±	0,6
41.664	Heptacoseno	3,5	6,94	2,71	4,4	±	2,2

3.2.3 Avaliação do papel do citral presente na glândula mandibular

A única resposta das espécies hospedeiras analisadas foi de agressão à fonte do composto testado. Alguns compostos não provocaram resposta alguma e nenhuma repelência aos compostos utilizados foi observada

As respostas obtidas dos diferentes grupos experimentais (citral sintético, extrato da glândula mandibular, extrato cefálico e controle) foram diferentes para as duas espécies analisadas (*F. varia e T. angustula*). Em *F.varia* foram observadas respostas agressivas em todos os grupos experimentais, sendo menos frequente apenas no grupo controle (Figura 11). Nesta espécie, não foram observadas diferenças significativas nas respostas entre os grupos citral sintético, extrato da glândula mandibular (GM) e extrato cefálico (GM *versus* Extrato Cefálico, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,5000; Extrato cefálico *versus* Citral Sintético, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,5000), o controle não é significativamente distinto do citral sintético e do extrato da glândula mandibular (GM *versus* Controle, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,0656; Controle *versus* Citral Sintético, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,0656), mas é significativamente diferente do extrato cefálico (Controle *versus* Extrato Cefálico, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,0147). Em *T. angustula*, foram observadas respostas agressivas com uma frequência grande em apenas dois grupos, extrato da glândula mandibular e extrato cefálico; somente uma amostra respondeu agressivamente ao citral sintético (Figura 11). Os dois primeiros grupos possuíram um padrão de resposta idêntico e se diferenciaram significativamente do controle (GM *versus* Controle, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,0147; Controle *versus* Extrato Cefálico, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,0147), o citral sintético embora não esteja separado significativamente desses dois grupos, possui diferenças importantes em relação a esses e está muito mais próximo ao grupo controle (GM *versus* Citral Sintético, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,0656; Controle *versus* Citral Sintético, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,5000).

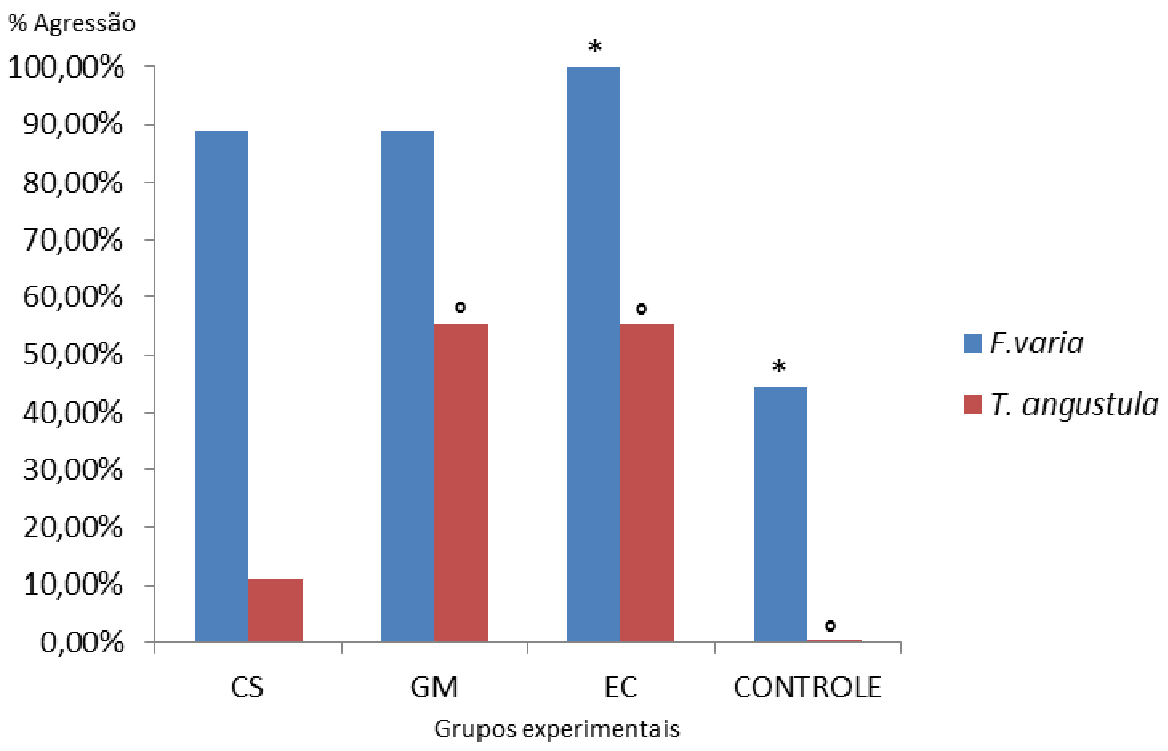


Figura 11. Proporção de respostas agressivas das operárias de *F. varia* e *T. angustula* aos diferentes grupos experimentais: CS - citral sintético; GM – extrato da glândula mandibular; EC – extrato da cabeça e Controle. * $p < 0,05$; ° $p < 0,05$.

3.2.5. Análise da cera depositada pelas operárias de L. limao nas colônias hospedeiras

A análise da cera depositada pelas operárias de *L. limao* nas colônias hospedeiras durante os ataques apresentou uma grande diversidade de compostos. A comparação desse material com os extratos das glândulas cefálicas não apresentou nenhuma correspondência com as secreções das glândulas mandibulares. No entanto, a comparação com o extrato dos ésteres acetato de hexadecila e acetato de 9-hexadecenila sintéticos, que foram encontrados na glândula salivar cefálica dessas operárias, permitiu identificar a presença desses dois compostos nessa cera (Figura 12).

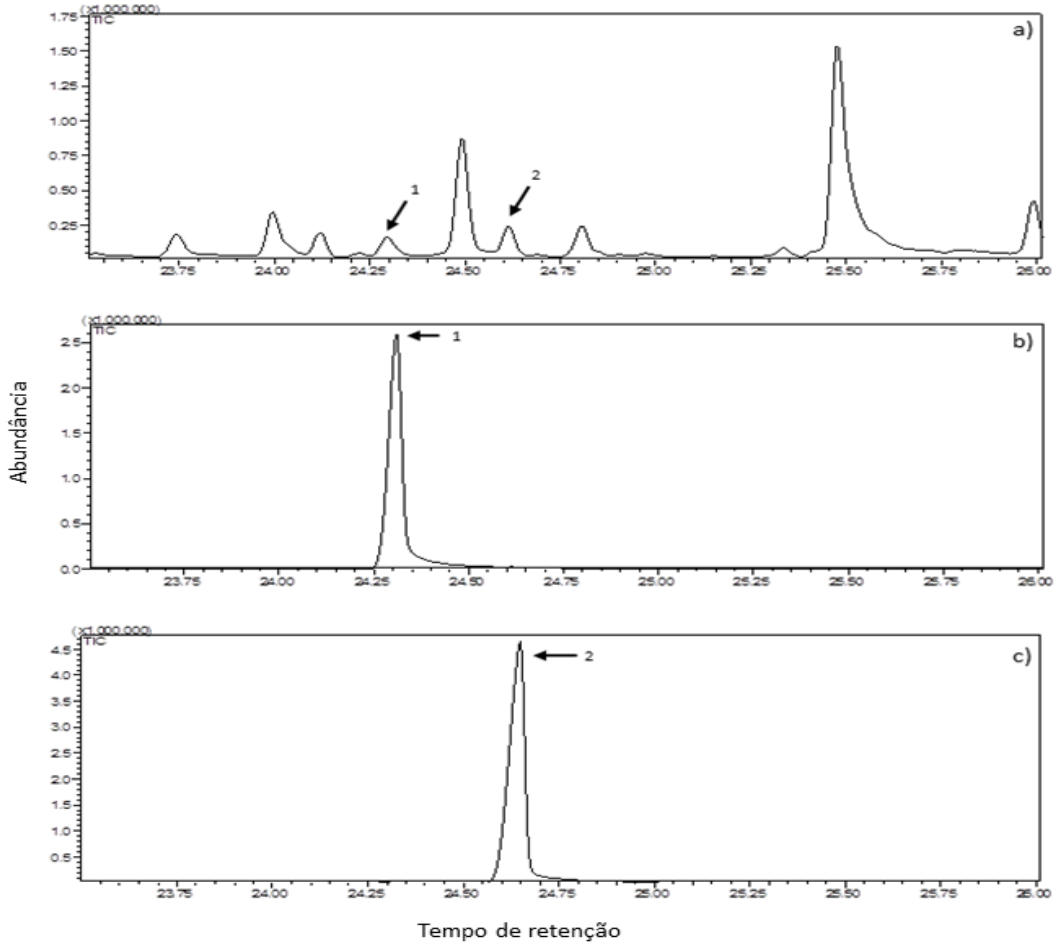


Figura 12. Comparação entre o extrato da cera de *L. limao* depositada durante o ataque (a) e os ésteres presentes na glândula salivar cefálica de operárias da mesma espécie sintetizados em laboratório; acetato de 9--hexadecenila (b) e acetato de hexadecila (c). 1 – acetato de 9-hexadecenila; 2 - acetato de hexadecila

3.2.6. Análise exploratória das respostas olfativas das operárias de F. varia ao extrato da cabeça de operárias de L.limao

Os primeiros testes com o uso do detector de eletricidade da antena (EAD, sigla em inglês) apontou a viabilidade metodológica nos estudos de detecção dos compostos relacionados ao comportamento de saque nas abelhas sem ferrão. As análises feitas até o momento tiveram o cunho exploratório e necessitam de repetições para as demais espécies hospedeiras estudadas, bem como o uso dessa ferramenta na exploração das

respostas da própria espécie parasita. Os testes realizados com antenas de *F. varia* apontaram a produção de um impulso elétrico para um dos isômeros do citral (Geranial), para os ésteres descritos na glândula salivar cefálica e ainda para o hidrocarboneto 9-nonacoseno descrito para a glândula mandibular dessas abelhas. As respostas apresentadas a esses compostos foram consistentes estando presentes em todas as 5 repetições realizadas. (Figura 13).

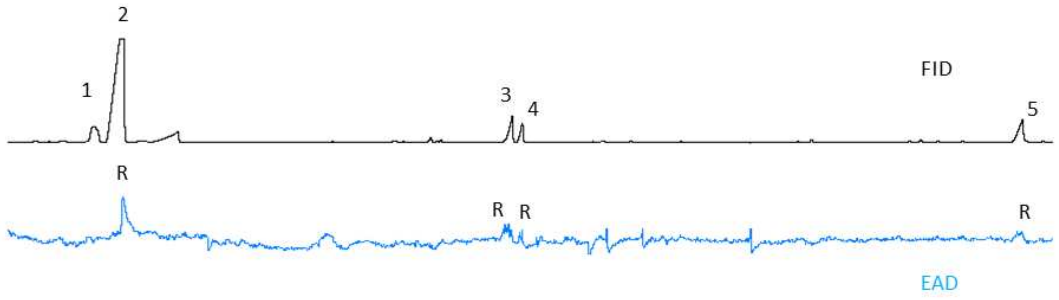


Figura 13. Resposta eletrofisiológica de antenas de *F. varia* expostas ao extrato cefálico de operárias de *L. limao*. Linha superior, conjunto dos compostos químicos detectados pelo detector de ionização de chama (FID). Linha inferior, resposta elétrica detectada pelo eletrodos ligados à extremidade das antenas (EAD). 1, Neral; 2, Geranial; 3, Acetato de 9-hexadecenila; 4, Acetato de hexadecila; 5, 9-nonacoseno; R, respostas fisiológicas que se repetiram em todas as cinco repetições dessa análise.

4. Discussão

4.1. Aspectos comportamentais

4.1.1. Uma abordagem econômica do comportamento cleptoparasita

As respostas relacionadas ao comportamento alimentar cleptoparasita podem ser analisadas sob uma perspectiva econômica. Segundo Krebs & Davies (1996), cada comportamento pode ser observado como tendo custos e benefícios associados e os animais que maximizaram os benefícios líquidos devem ter sido selecionados positivamente. Sendo assim, o entendimento da evolução de um comportamento alimentar está diretamente relacionado à avaliação dos custos e benefícios associados a esse comportamento. Os benefícios podem ser calculados atribuindo um determinado valor (V) para o recurso a ser forrageado, que tem relação direta com todo ganho energético resultante do forrageio. O custo (C), por sua vez, pode ser calculado atribuindo-se um custo ao forrageio e está relacionado às perdas inerentes a qualquer estratégia alimentar, como o gasto energético do deslocamento para as fontes alimentares e o risco de predação, por exemplo. O sucesso de determinada estratégia alimentar pode ser medido por várias maneiras, o que inclui uma análise de sua eficiência (V/C) e de seu benefício líquido (V-C) (Roubik, 1989).

É importante ressaltar que a análise do sucesso de qualquer comportamento deve ser realizada sob uma perspectiva do aumento do valor adaptativo proporcionado por ele, ou seja, deve ser analisado considerando o aumento gerado na capacidade de sobrevivência e reprodução dos organismos que possuem esse comportamento. Assim, dentro desta abordagem, considera-se que um aumento do valor adaptativo de um indivíduo está relacionado diretamente com uma maximização dos ganhos e minimização dos custos proporcionados por uma determinada estratégia alimentar.

No presente trabalho, essa abordagem será utilizada na interpretação dos dados relativos à escolha da colônia hospedeira e na discussão sobre a evolução do comportamento cleptoparasita em abelhas em ferrão.

4.1.2. Escolha da colônia hospedeira

Apesar de enfrentar algumas dificuldades, os estudos dentro da casa vegetação produziram resultados interessantes. Os resultados obtidos mostram a utilidade das casas de vegetação para a realização de testes deste tipo. Foi possível caracterizar com clareza a respostas de cada espécie hospedeira aos ataques de *L. limao.* A análise desses comportamentos permitiu a identificação de três respostas possíveis aos saques, uma passiva (*N. testaceicornis*) e outras duas defensivas, sendo uma agressiva (*T. angustula*) e outra não agressiva (*F. varia*). A primeira resposta caracteriza-se pela ausência de agressão às operárias invasoras e pela paralisação das operárias hospedeiras até o fim do ataque. A segunda corresponde a uma defesa agressiva através do ataque das hospedeiras às operárias saqueadoras. O terceiro tipo de resposta é caracterizado por uma resposta não agressiva, mas de defesa por obstrução da entrada da colônia.

Há ainda outro dado bastante relevante, referente à taxa de sucesso dos ataques. Foi observado que nem todos os saques são bem sucedidos, evidenciando que a defesa da espécie hospedeira pode ser eficaz para evitar um ataque, o que representa um alto custo para as operárias de *L. limao.* Duas espécies conseguiram evitar os saques, *F. varia* e *T. angustula* (conseguiram evitar 60% e 33,33% dos ataques, respectivamente). Esses dados, quando relacionados com os dados de escolha, mostram que as espécies que se defendem são atacadas com uma frequência menor (Tabela 1).

A abordagem econômica pode ser muito útil para entender os resultados encontrados. Conforme dito anteriormente, devem ter sido selecionados os animais que realizaram comportamentos que maximizaram seus benefícios líquidos (BL). No caso das abelhas cleptoparasitas é necessário analisar a relação entre os custos e benefícios do saque em cada espécie hospedeira. Assim, é possível inferir qual espécie hospedeira oferece os maiores benefícios líquidos (BL = V-C).

No caso das abelhas que visitam flores, o valor de um recurso pode ser definido em termos de concentração e quantidade de néctar e pólen presente em cada flor, bem como através da distribuição espacial desse recurso (Leslie *et al.*, 1974). Quando uma colônia de abelhas sem ferrão é analisada sob esses mesmos parâmetros, nota-se o seu alto valor como recurso alimentar. Em uma colônia, os recursos estão concentrados não só espacialmente, uma vez que o pólen e o néctar de várias plantas dispersas pelo ambiente estão concentrados nos potes de alimento, mas também temporalmente, já que, provavelmente, os recursos das flores de várias estações diferentes também estão armazenados ali. Além disso, alguns alimentos dentro dos ninhos possuem um valor agregado, resultado do trabalho aplicado neles pelas operárias, como o mel, formado através desidratação do néctar. Há, também, um alimento dentro da colônia com um valor nutricional muito grande: o alimento larval, sendo esse a mistura de mel, polen e secreções glandulares. Ainda, existem outros recursos dentro da colônia que possuem um alto valor, como a resina e os materiais de construção de ninho, que também são saqueados pelas operárias de *L. limao.* Assim, uma colônia de abelha sem ferrão é uma fonte de recurso com um valor altíssimo quando comparada à flores.

No entanto, ao mesmo tempo em que possui um retorno muito alto, a utilização de colônias como recurso alimentar possui também um custo elevado, uma vez que as abelhas sem ferrão possuem diversas maneiras de defesa dos seus recursos, como a agressão através de mordidas e deposição de resina contra possíveis invasores (Michener, 1974). Essas abelhas possuem, também, mecanismos para diferenciar os companheiros de ninho dos outros indivíduos (Nunes *et al.*, 2008). Desse modo, invadir uma colônia de abelhas sem ferrão não é uma tarefa fácil e possui um risco muito grande associado. Os custos dessa estratégia alimentar podem ser medidos, principalmente, pela resposta das colônias hospedeiras aos ataques, sendo que colônias que oferecem resistência possuem custos maiores do que aquelas que não oferecem

resistência. A existência de ataques fracassados e morte de indivíduos, por exemplo, indicam um alto custo atrelado ao comportamento de saque.

Dado que no experimento de escolha realizado foram utilizadas colônias hospedeiras que possuíam, de maneira geral, o mesmo tamanho e a mesma quantidade de alimento, pode-se assumir que, do ponto de vista do valor do recurso, todas as colônias hospedeiras eram aproximadamente iguais ($V_{N.\ testaceicornis} \approx V_{T.\ angustula} \approx V_{F.varia}$). Embora seja difícil estimar com precisão o valor das colônias hospedeiras, o importante é perceber que a diferença maior entre elas se dá quando as variáveis relacionadas ao custo do saque em cada uma são analisadas.

De acordo com os dados obtidos, três valores de custos podem ser considerados. O primeiro está relacionado com o comportamento de defesa de *T. angustula* ($C_{T.\ angustula}$) esse comportamento resulta em um custo elevado para as abelhas saqueadoras, uma vez que vários indivíduos são mortos nos ataques, além de ser uma estratégia de defesa eficiente para evitar algumas tentativas de saque. O outro valor de custo está associado à defesa de *F. varia* ($C_{F.\ varia}$), embora essa espécie não reaja agressivamente aos ataques, ela possui uma eficiente estratégia de defesa (*i.e.* fechar a entrada da colônia com resina), que também resulta em saques mal sucedidos. Desse modo, o ataque a essa espécie, apesar de não ter um custo tão elevado como em *T. angustula*, possui um custo maior que em *N. testaceicornis* ($C_{N.\ testaceicornis}$), cujos custos são mínimos, dado que as operárias dessa espécie não reagem agressivamente e os ataques a ela sempre são bem sucedidos. Assim, é possível afirmar que $C_{T.\ angustula} > C_{F.\ varia} > C_{N.\ testaceicornis}$ e que, portanto, o ataque a *N. testaceicornis* possui o maior benefício líquido, seguido de *F. varia* e, por último, *T. angustula.* Isso possui uma relação direta com os dados de escolha obtidos. Estes dados indicam uma menor frequência de ataques a espécie que oferece custos mais elevados (*T. angustula* = 20% dos ataques) e uma maior frequência de ataques às espécies que respondem passivamente aos ataques (*F.*

varia e *N. testaceicornis*). As duas espécies que respondem desta maneira sofreram, juntas, 80% dos ataques realizados.

A evidência de que existe algum tipo de preferência das colônias hospedeiras sugere que as abelhas saqueadoras consigam avaliar a colônia a ser pilhada antes de iniciar um ataque. Portanto, as operárias de *L. limao* devem utilizar algum sinal presente nas colônias hospedeiras que permita identificá-las. De fato, em algumas ocasiões, um dia antes da ocorrência dos ataques, foi possível encontrar alguns indivíduos mortos na frente das colônias que viriam a ser atacadas, o que pode indicar a existência de escoteiras nessa espécie, que avaliariam as colônias antes de um ataque acontecer. No entanto, isso não pôde ser confirmado pelas observações realizadas. A investigação da existência desses sinais pode ser um objeto interessante de estudos futuros. Além disso, o mecanismo de tomada de decisão realizada pelas abelhas cleptoparasitas, utilizado na escolha da colônia hospedeira também é um campo fértil para investigações futuras.

4.1.3. Novas informações sobre o cleptoparasitismo em L. limao

Os ataques realizados seguiram as características já descritas na literatura (Sakagami *et al.*, 1993), com as operárias saqueando mel, pólen, cerúmen e alimento larval. No entanto, no experimento realizado foram obtidas informações novas, como a descrição dos ataques em *F. Varia*, visto que não havia na literatura nenhum registro de saque a essa espécie.

Um dado importante sobre o comportamento das operárias hospedeiras é a paralisação dos indíviduos de *F. varia* e *N. testaceicorns* durante os ataques (Figura 4). Quando estão sendo saqueadas, essas duas espécies possuem um comportamento muito semelhante, no qual todos os indivíduos permanecem parados e agrupados entre as células de cria. Além disso, antes de ficarem completamente paradas, as operárias consomem o que conseguem dos potes de mel, ficando com os seus papos cheios de

alimento. A semelhança deste comportamento nas duas espécies distintas sugere que exista um mesmo sinal, proveniente das saqueadoras, que o desencadeie. É possível, então, que exista algum composto liberado pelas operárias de *L. limao* que provoque essa reação nas operárias hospedeiras. Os resultados obtidos nos bio-ensaios realizados, não permitiram identificar esse sinal químico. Esses dados mostraram apenas que se existe algum composto responsável por desencadear esse comportamento, provavelmente não é o citral presente na glândula mandibular das operárias saqueadoras, visto que esse composto resultou em agressão pelas operárias de *F. varia* e não recuo das mesmas quando apresentado na entrada da colônia. Para identificar a existência desse sinal, são necessários estudos futuros que avaliem a resposta das hospedeiras ao conteúdo das outras glândulas exócrinas de *L. limao.*

Outro interessante dado obtido está relacionado ao cerúmen depositado pelas operárias *L. limao* na colônia hospedeira (Figura 6). A deposição deste cerúmen está amplamente descrita na literatura (Sakagami *et al.*, 1993, Sakagami & Laroca, 1963; Nogueira Neto, 1970), no entanto, até o momento nenhuma função tinha sido atribuída a este material. Foi possível observar que este cerúmen provocou uma forte atração das operárias invasoras quando colocado em uma placa de vidro ao lado do local onde estava a colônia atacada. Desse modo, este material deve possuir uma função chave no recrutamento das operárias saqueadoras até o ninho atacado.

Outra observação dos ataques realizados chama bastante atenção. Foi possível observar que as operárias de *L. limao* transportavam o pólen saqueado da colônia de *F. varia* na corbícula (Figura 7). Vários autores descrevem a ausência de corbícula nessa espécie (Sakagami & Laroca, 1963; Michener, 1974; Sakagami *et al.* 1993), sendo essa considerada, inclusive, uma característica morfológica relacionada ao comportamento cleptoparasita dessa espécie. No entanto, os dados obtidos no presente trabalho evidenciam que apesar dessa estrutura possuir modificações nessa espécie, ela está

presente e é funcional no transporte de pólen. Essa observação é extremamente importante, visto que este é o primeiro registro da utilização dessa estrutura para o transporte de pólen nessa espécie.

4.2. Aspectos eco-químicos

4.2.1. Perfil dos compostos presentes nas glândulas mandibular e salivar cefálica

Os resultados obtidos através da análise química dos extratos das glândulas salivar cefálica e mandibular permitiram identificar e quantificar os compostos presentes em cada glândula e, portanto, determinar a origem dos compostos encontrados na cabeça das operárias de *L. limao*. É possível perceber que a glândula salivar cefálica apresenta uma riqueza de compostos muito maior quando comparada com a glândula mandibular, sendo que esta apresenta somente o citral e o 9-nonacoseno. A presença do 9-nonacoseno na amostra pode ser resultado de contaminação dos compostos presentes na cutícula, uma vez que este hidrocarboneto esta presente em grande concentração na cutícula de *L. limao* (Nunes *et al.*, 2008). No entanto, se a amostra tivesse sido de fato contaminada, seria possível encontrar outros hidrocarbonetos que também estão presentes em grande concentração na cutícula dessa espécie (Nunes *et al*., 2008), o que não aconteceu. A análise das duas glândulas permitiu identificar também que além do citral, outros dois compostos também estão presentes em grande concentração na cabeça das operárias, os ésteres acetato de 9-hexadecenila e acetato de hexadecila compostos principais da glândula salivar cefálica. Embora esses compostos já tenham sido descritos em outras análises (Francke *et al.*, 2000), é a primeira vez que a sua origem glandular é determinada.

Os resultados das análises químicas, quantitativa e qualitativa, realizadas com os extratos das glândulas da cabeça de *L. limao* diferem bastante daqueles obtidos por outras análises dos compostos da cabeça desta espécie (Blum, 1970; Wittmann *et al.*, 1990; Francke *et al.*, 2000). Foram encontrados 24 compostos que não estão descritos nos trabalhos anteriores (Blum, 1970; Wittmann *et al.*, 1990). Além disso, alguns compostos descritos em outros trabalhos, como, por exemplo, o composto 6 metil-5-hepten-2-ona, descrito por Wittmann (1990) como o principal composto, ao lado do

citral, responsável pela resposta agressiva provocada em *Tetragonisca angustula*, não foi encontrado em nenhuma das duas glândulas analisadas. Sendo assim, é possível que este e os outros compostos identificados em trabalhos anteriores estejam na glândula hipofaringeana ou na glândula intramandibular, as outras duas glândulas presentes na cabeça das operárias que não foram investigadas no presente estudo (Cruz-Landim, 2009). Este resultado sugere a necessidade de uma análise dos compostos presentes nessas glândulas para que seja possível compreender melhor a origem dos compostos utilizados pelas operárias de *L. limao.*

A diferença na qualidade das informações fornecidas pelas análises dos extratos puros das glândulas mandibulares e salivar cefálica, quando comparada ao extrato da cabeça inteira, fica bem evidente pelos resultados obtidos no presente trabalho. Somente cinco compostos foram encontrados na análise do extrato da cabeça inteira das operárias de *L. limao* (Tabela 5), número bem inferior em relação à quantidade de compostos presentes na glândula salivar cefálica e mandibular (Tabelas 2 e 4).

Isso ocorre porque a análise cromatográfica gera um resultado com as concentrações relativas dos compostos presente no extrato da cabeça. Desse modo, concentrações muitas altas de um determinado composto resultam em picos, proporcionalmente, mais baixos para os demais compostos. No caso do extrato da cabeça de *L. limao*, o citral está presente em uma concentração muito elevada, e, portanto, todos os demais compostos aparecem com picos muito baixos, ou nem mesmo aparecem, nos resultados das análises cromatográficas desse extrato. Sendo assim, a análise de cada glândula, separadamente, permitiu uma resposta mais precisa sobre os compostos presentes na cabeça de *L. limao*.

Outro resultado que merece destaque é a proporção dos isômeros do citral na glândula mandibular dessas abelhas. De acordo com os dados obtidos, a proporção dos isômeros geranial e neral no citral sintético é de aproximadamente 1:1 e no citral da

glândula mandibular essa proporção é de 19:1. Isso se torna importante dado que diferentes proporções de isômeros podem influenciar muito na resposta a determinado composto, podendo, inclusive, inibir a resposta a esse composto (Morgan, 2004). O que, de fato, pôde ser observado nos bio-ensaios realizados.

4.2.2. Papel biológico dos ésteres presentes na glândula salivar cefálica

Os compostos encontrados nas duas glândulas se assemelham muito àqueles encontrados em *Geotrigona mombuca* (Stangler *et al.*, 2009). Nesta espécie, a glândula mandibular também possui somente dois compostos, o nonanal e o citral, sendo este último o composto majoritário, enquanto todos os outros compostos estão presentes na glândula salivar cefálica, sendo o principal composto desta glândula um éster, o butanoato de farnesila (Stangler *et al.*, 2009).

Stangler *et al.* (2009) demonstraram, através de bio-ensaios, que os ésteres presentes na glândula salivar cefálica de *G. mombuca* têm um importante papel na formação de trilhas químicas, que são muito importantes no recrutamento de forrageiras para fontes de alimento. Esse mesmo papel dos ésteres da glândula salivar cefálica também foi demonstrado para as espécies *Trigona recursa* (Jarau *et al.*, 2006) e *Trigona spinipes* (Schorkopf *et al.*, 2007), sendo os ésteres decanoato de hexila e octanoato de octila, respectivamente, os compostos principais nas glândulas salivares cefálicas nestas espécies. Todos esses ésteres encontrados nessas espécies, assim como aqueles encontrados em *L. limao,* possuem entre 16 e 19 átomos de carbono.

Além da semelhança dos ésteres encontrados nas outras espécies estudadas com aqueles encontrados na glândula salivar cefálica de *L. limao*, a presença desses compostos na cera depositada pelas operárias dessa espécie nas colônias hospedeiras, somada às observações comportamentais que indicam uma forte atração das operárias por essa cera, sugere fortemente que tais compostos podem ser usados por operárias de

L. limao na indicação do local da fonte de alimento, nesse caso, a colônia que está sendo atacada. Além disso, a análise das respostas olfativas das abelhas hospedeiras evidenciou que esses compostos provocam respostas nas antenas destas abelhas, de modo que os ésteres da glândula salivar cefálica devem ter também algum papel na comunicação interespecífica durante os ataques.

Portanto, os ésteres acetato de 9-hexadecenila e acetato de hexadecila, podem ter um papel muito importante durante o ataque dessas abelhas. É importante ressaltar, no entanto, que são necessários bio-ensaios com os compostos isolados para que se possa determinar com precisão a função desses compostos na indicação da fonte do alimento e na comunicação interespecífica durante os ataques. Desse modo, esses compostos devem ser alvos importantes para investigações futuras que visem compreender melhor a comunicação química do recrutamento em *L. limao*.

4.2.2. Papel biológico do citral

Os resultados obtidos, decorrentes do bio-ensaio realizado com extratos da glândula mandibular, trouxeram novas e importantes informações a respeito da função do citral. Todos os estudos realizados até o momento sugerem que o citral de *L. limao* ou possui uma função repelente sobre as abelhas atacadas (Wittmann, 1985; Wittman *et al..*, 1990; van Zweden *et al..*, 2011) ou atua atrapalhando a comunicação e, por consequência, prejudicando a capacidade de defesa das abelhas atacadas (Blum, 1970; Pompeu & Silveira, 2005). No entanto, estes trabalhos se basearam em bio-ensaios nos quais foi utilizado apenas citral sintético (Wittmann, 1990; Pompeu & Silveira, 2005; Blum, 1970; van Zweden *et al..*, 2011). Wittmann (1990) e van Zweden *et al..* (2011) descrevem uma reação de *T. angustula* ao citral sintético muito menos intensa quando comparada à reação observada como resposta a presença de indivíduos de *L. limao.* Pompeu & Silveira (2005) e Blum (1970), por sua vez, descrevem uma sensibilidade

diferencial ao citral sintético em algumas espécies de abelhas sem ferrão e relacionam essa sensibilidade com a eficiência na defesa de suas colônias aos ataques de *L. limao*. No entanto, as respostas ao citral obtidas por esses autores podem não estar relacionadas à reação que o citral presente na glândula mandibular de *L. limao* de fato provoca, uma vez que a proporção dos isômeros deste composto sintético é muito diferente quando comparado aquele produzido por *L. limao.*

Os dados obtidos demonstram que existe uma importante diferença entre as respostas provocadas pelo citral sintético e pelo extrato da glândula mandibular em pelo menos uma das espécies avaliada, a *T. angustula.* Nessa espécie, embora a análise estatística não tenha separado significativamente os grupos citral sintético e extrato da glândula mandibular (GM *versus* Citral Sintético, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,0656), as respostas das operárias ao citral sintético foram, claramente, muito mais semelhantes às respostas do grupo controle do que às respostas do extrato da glândula mandibular (Controle *versus* Citral Sintético, Fisher´s exact, n = 9, p = 0,5000), sendo que estas últimas são idênticas aquelas provocadas pelo extrato da cabeça das operárias de *L. limao*. Assim, os resultados obtidos mostram que existem diferenças comportamentais importantes entre o citral sintético e aquele presente na glândula mandibular. Desse modo, todas as informações existentes na literatura até o momento, relativas à função do citral e a reação que ele provoca nas espécies hospedeiras, podem conter imprecisões.

Além disso, os resultados dos bio-ensaios trazem outra importante informação. Os dados mostraram que quando o extrato da glândula mandibular provocou alguma resposta nas operárias hospedeiras, a reação exibida por esses indivíduos foi agressiva, sendo que as agressões mais intensas ocorreram em *F. varia.* Esses dados contradizem a hipótese de que o citral atue como arma química (Wittmann, 1990; Pompeu & Silveira, 2005; Blum, 1970; van Zweden *et al.*., 2011), uma vez que nenhum dos grupos experimentais provocou nem repelência, nem atrapalhou a comunicação de defesa das

espécies hospedeiras, ao contrário, desencadeou uma defesa agressiva nas duas espécies testadas. Assim, aparentemente, o citral funciona muito mais como um sinal que indica para as hospedeiras a presença das abelhas saqueadoras e não como arma química causando fuga das hospedeiras, ou seja, esse composto é muito mais um cairomônio do que um alomônio, quando analisado na perspectiva da comunicação interespecífica que ocorre durante os ataques de *L. limao.* É mais provável que o citral possua uma função importante para as abelhas cleptoparasitas na comunicação intraespecífica, talvez como ferômonio de alarme, ou como um sinal que coordene o ataque, indicando seu início e encerramento.

Sendo assim, uma contribuição importante das novas informações obtidas é que elas desmistificam a afirmação sobre o papel do citral como arma química. Embora até hoje nenhum estudo mais robusto tenha sido realizado, esta informação está amplamente presente na literatura. É curioso observar que mesmo nos estudos que propõem essa função para o citral, somente respostas agressivas, e nenhuma repelência, foram encontradas (Wittmann, 1990; Pompeu & Silveira, 2005; Blum, 1970; van Zweden *et al.*., 2011). Por outro lado, tornam-se necessárias novas investigações que procurem identificar os sinais responsáveis pelo desencadeamento da repelência e paralisação observadas em *F. varia* e em *N. testaceicorns.*

4.3. A evolução do cleptoparasitismo em abelhas sem ferrão

A análise da evolução do comportamento cleptoparista em abelhas sem ferrão inclui uma avaliação da interação ecológica resultante da utilização de colônias como recurso alimentar. É importante perceber que a consequência dessa estratégia alimentar é a competição direta por um recurso com um valor muito alto. Assim, para entender a evolução do cleptoparasitismo é necessário entender os mecanismos que possibilitaram a evolução de uma estratégia de disputa em Meliponini.

Antes, é importante estabelecer algumas premissas relacionadas à luta pelos recursos de uma colônia:

1- Quanto maior o exército de uma colônia (representado pelo número de operárias), maiores são as chances de sucesso no confronto, tanto na defesa como no ataque;

2- O número do exército está diretamente relacionado com a quantidade de recurso defendida, isto é, colônias com poucas operárias possuem também poucos recursos armazenados.

Estabelecidas essas premissas, passa-se para uma análise dos valores e dos custos associados a cada uma das duas estratégias alimentares. Na primeira estratégia, que será chamada de “forragear em flores”, os benefícios resultantes do esforço de forrageio, são, basicamente, a diferença entre a quantidade de pólen e néctar presente em cada flor e o gasto energético realizado pelas operárias para se deslocarem até a fonte do alimento, podem existir, também, outros custos associados, como o risco de predação e a competição com outros animais pelos recursos florais. As operárias de abelhas sociais coletam alimento além da sua necessidade, que é utilizado para alimentação das larvas ou armazenado na colônia (Michener, 1974), ou seja, a estratégia alimentar em questão resulta em excedente de alimento. Assim, os custos associados a

esta estratégia são menores do que os valores oferecidos por elas. É possível, portanto, afirmar que o benefício líquido da estratégia “forragear em flores” é sempre positivo.

A segunda estratégia, que será chamada de “saquear colônias”, é mais complexa que a primeira. Nessa estratégia, o benefício líquido da coleta de alimento só é positivo caso as saqueadoras vençam a disputa pelo recurso. Na verdade, só existe algum retorno em caso de vitória, caso contrário, só existem custos. Os custos de perder uma luta, por sua vez, são muito elevados e estão relacionados, principalmente, à perda de indivíduos durante o confronto. Adicionando às premissas estabelecidas anteriormente a análise dessa estratégia alimentar, é possível afirmar que o sucesso de um ataque está correlacionado com o tamanho da colônia que vai ser atacada - quanto menor for o número de abelhas na colônia hospedeira, mais chances a abelha saqueadora terá de vencer (premissa 1). Ao mesmo tempo, quanto menor o número de abelhas na colônia hospedeira menor o retorno do forrageio para as saqueadoras, uma vez que colônias menores possuem menos recursos (premissa 2). Desse modo, a estratégia cleptoparasita tem dois tipos de resultados, ataques fracassados, que são muito negativos, e ataques bem sucedidos, cujo retorno, embora esteja relacionado a um recurso com alto valor (ver seção 4.1.2), não são necessariamente muito elevados, devido à correlação entre chances de sucesso e tamanho da colônia hospedeira. Sendo assim, o saque a colônias de abelhas sem ferrão é um comportamento alimentar que possui um risco associado muito alto e, ao mesmo tempo, possui uma eficiência limitada às colônias menores.

Portanto, para entender a evolução do cleptoparasitismo, é necessário entender como uma estratégia alimentar de alto risco e custos elevados (“saquear colônias”) superou uma estratégia cujos retornos são sempre positivos (“forragear em flores”). Para explicar isso, propomos que a característica que possibilitou a evolução desse comportamento em *L. limao* foi a evolução de um maior número de ovaríolos nas rainhas dessa espécie. Segundo Sakagami (1982), as rainhas de *L. limao* possuem de 10

a 15 ovaríolos por ovário, enquanto a maioria das abelhas sem ferrão possui apenas quatro.

Essa grande quantidade de ovaríolos possibilita que essa espécie possua colônias com muitos indivíduos quando comparada às outras espécies de abelhas sem ferrão. Nesse caso, o cenário para a estratégia alimentar cleptoparasita se torna mais favorável. O maior número de operárias resulta em um exército grande de abelhas saqueadoras e, assim, as chances de vencer uma disputa pelos recursos de uma colônia se tornam bem maiores. Do mesmo modo, o sucesso dos ataques não se limita mais a colônias pequenas e com pouco alimento armazenado, um exército grande possibilita o enfretamento de colônias fortes e cheias de recurso, mas que possuem exército de defesa menor quando comparadas as abelhas saqueadoras. Além disso, o custo da perda de indivíduos devido aos combates torna-se relativamente menor, uma vez que eles podem ser repostos rapidamente.

Assim, a evolução de um grande número de ovaríolos nessa espécie pode ter permitido que a utilização de colônias de outras abelhas sem ferrão como recurso alimentar se tornasse uma estratégia menos arriscada, bem como permitiu o aumento do retorno associados a esse recurso alimentar.

É importante ressaltar que essa hipótese precisa ser melhor investigada por estudos futuros. A análise do número de ovaríolos em *Cleptotrigona*, outro grupo cleptoparasita obrigatório de abelhas sem ferrão, pode ajudar a elucidar a relação entre o número de ovaríolos e o comportamento de saque. Além disso, a espécie *Melipona fuliginosa* também poderia ser um modelo interessante para esse estudo, pois parece ter um comportamento intermediário, visitando flores e realizando saques frequentemente (Nogueira-Neto, 1970). Apesar disso, a proposta aqui apresentada objetiva estabelecer algumas bases que podem ajudar a reconstruir as condições ecológicas que permitiram o surgimento do cleptoparasitismo em abelhas sem ferrão.

Outro aspecto bastante relevante sobre a evolução do cleptoparasitismo se refere ao número de vezes que esse comportamento surgiu dentro do grupo das abelhas sem ferrão. É possível dizer que esse comportamento surgiu de maneira obrigatória em dois momentos independentes durante a evolução de Meliponini, visto que a linhagem Afrotropical e a linhagem Neotropical de meliponíneos, onde estão presentes, respectivamente, os grupos *Cleptotrigona e Lestrimelitta*, divergiram entre si a mais de 80 milhões de anos e os dois grupos cleptoparasitas são grupos derivados dentro de cada linhagem (Rasmussen & Cameron, 2010). Desse modo, é possível dizer que o cleptoparasitismo em abelhas sem ferrão é uma característica homoplástica. Além das duas vezes em que o cleptoparasitismo obrigatório evoluiu, há ainda pelo menos mais um grupo (*Melipona fuliginosa*, Nogueira-Neto, 1970) em que o comportamento de saque facultativo evolui.

4.3.1 O abandono das flores

Embora a evolução de um número grande de ovaríolos ajude a explicar a existência do saque como estratégia alimentar, ela não é útil para entender o motivo da obrigatoriedade do cleptoparasitismo nessas abelhas. Dentro da abordagem econômica, como explicar o abandono durante a evolução do grupo de um recurso que sempre oferece benefícios líquidos positivos?

A hipótese da *"Rainha Vermelha"* pode ser útil para entender o abandono desse recurso. O significado dessa hipótese é que a coevolução parasita-hospedeiro pode levar a uma dinâmica oscilatória da frequência gênica nas populações de ambos, parasitas e hospedeiros (Lively, 2001). Esse conceito pode ser entendido do seguinte modo. Um parasita provoca diminuição no valor adaptativo dos hospedeiros, de maneira que hospedeiros que possuem algum tipo de defesa ao parasita são selecionados; hospedeiros mais resistentes provocam, por sua vez, diminuição do valor adaptativo dos

parasitas, selecionando parasitas que conseguem superar essas defesas. Esse processo continua ao longo das gerações, resultando, assim, em uma dinâmica oscilatória na frequência gênica de parasitas e hospedeiros.

No caso das abelhas cleptoparasitas, a estratégia de saque deve ter resultado na seleção de abelhas hospedeiras que reagiam muito agressivamente ao identificar as cleptoparasitas perto das suas colônias. De fato, é possível perceber que algumas abelhas sem ferrão reagem muito agressivamente quando em contato com indivíduos de *L. limao* (Wittmann, 1985; Wittmann *et al.*., 1990; Nunes *et al.*., 2008). Desse modo, existe um comportamento agonista evidente contra as operárias de *L. limao.* Isso pode ter resultado em conflitos nas próprias flores, sendo que operárias de outras espécies reagiriam agressivamente à presença das abelhas saqueadoras que estivessem coletando nas mesmas flores, ou em flores próximas. A disputa por recursos florais, com desencadeamento de comportamentos agonistas, não é uma característica rara em abelhas sem ferrão (Leslie *et al.*,1974), o que torna provável essa hipótese.

Sendo assim, operárias de *L. limao* que visitassem flores estariam mais sujeitas a encontros com operárias de outras espécies e, portanto, mais sujeitas à morte. Isso associaria um custo alto às flores para as abelhas cleptoparasitas, custo esse que talvez superasse os benefícios oferecidos pelos recursos florais. Nesse contexto, o comportamento exclusivamente cleptoparasita deve oferecer um retorno maior que um comportamento parasita facultativo e, portanto, deve ter também um valor adaptativo maior.

4.4. Uma nova classificação para o parasitismo em abelhas

O parasitismo pode ser definido como o modo de vida de organismos que sobrevivem à custa de outros organismos, sem nenhum benefício direto para os últimos (Nogueira-Neto, 1970). Esta característica está amplamente presente em abelhas, sendo que 15% do grupo de abelhas possui esse tipo de interação ecológica (Bohart, 1970).

De maneira geral, nas abelhas solitárias o parasitismo consiste em invadir o ninho de outras colônias e colocar seus ovos no alimento larval da espécie hospedeira, o qual a larva parasita utilizará para se alimentar. Essas abelhas também são conhecidas como “abelhas cuckoo”, em referência ao grupo de pássaros que realiza comportamento semelhante (Bohart, 1970; Nogueira-Neto, 1970.). Em *Psithyrus* (grupo pertencente à Bombini), as rainhas invadem o ninho alheio e, ao invés de se utilizar do alimento larval, ela toma posse da colônia hospedeira, coloca seus ovos nessa colônia e a larva resultante é alimentada diariamente pelas operárias do ninho parasitado (Bohart, 1970; Nogueira-Neto, 1970).

Embora o parasitismo nessas abelhas seja usualmente classificado como cleptoparasita, ele possui algumas diferenças importantes em relação ao comportamento realizado pelos grupos cleptoparasitas de abelhas sem ferrão, *Lestrimelitta e Cleptotrigona*, sendo que essas diferem das demais por três características principais: elas não invadem os ninhos alheios para colocar seus ovos nas células de cria hospedeiras; elas não coletam seu alimento em flores; e elas trabalham nos seus próprios ninhos, do mesmo modo que outros membros não parasitas do grupo (Nogueira-Neto, 1970).

A distinção comportamental, nesse caso, justifica uma classificação diferente para cada estratégia parasita. Enquanto nas abelhas cuckoo e em *Psithyrus* o parasitismo está relacionado ao comportamento de oviposição, nos gupos parasitas de abelhas sem ferrão está relacionado ao comportamento alimentar. Isso resulta em diferenças

importantes nas adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, relacionadas a cada estratégia parasita, que deixam sem sentido prático a classificação sob o mesmo nome desses diferentes tipos de comportamento. Uma classificação útil para os distintos tipos de parasitismo foi proposta por Breed *et al.* (2012):

- *Cleptoparasitismo*: Roubo do alimento ou de algum outro item de valor de outro animal (*Lestrimelitta e Cleptotrigona)*;

- *Parasitismo de cria:* Colocar ovos no ninho de outro animal, para ser criado por este animal (*"abelhas cuckoo"*);

- *Inquilinismo:* Viver dentro de um grupo social como um parasita social, colocando seus ovos, que serão criados pelas operárias da colônia hospedeira (*Psithyrus).*

Além de abrigar sob o mesmo nome coisas tão diferentes, utilizar a mesma classificação gera confusão e prejudica o conhecimento sobre o parasitismo em abelhas. Por exemplo, Cardinal *et al.* (2011) realizaram uma análise filogenética, baseada em dados moleculares, onde afirmam que a origem do cleptoparasitismo em Apidae é antiga e que essa característica surgiu apenas 4 vezes dentro desse grupo. No entanto, esses autores não utilizaram em suas análises nenhuma amostra dos grupos cleptoparasitas de abelhas sem ferrão, sendo esses grupos ignorados completamente nessa revisão. Assim, uma importante informação sobre o cleptoparasitismo em Apidae está ausente e prejudica bastante as afirmações realizadas no trabalho.

As definições propostas por Breed *et al.* (2012) estabeleceram as bases para uma nova intepretação do parasitismo em abelhas. É importante, agora, que uma nova classificação de consenso, que vise facilitar o estudo sobre os diferentes tipos de comportamento presentes nesse grupo, seja estabelecida.

5. Referências Bibliográficas

Ayala, R. 1999. Revision de las abejas sin aguijon de Mexico (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Folia Entomológica Mexicana, 106: 1-123.

Barth, F. G.; Hrncir. M.; Jarau, S. 2008. Signals and cues in the recruitment behavior of stingless bees (Meliponini). *Journal of Comparative Physiology* A, 194: 313–327.

Bego, L. R.; R. Zucchi & S. Mateus. 1991. Notas sobre a estratégia alimentar (cleptobiose) de *Lestrimelitta limao* Smith (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Naturalia* 16: 119-127.

Blum, M. S. 1966. Chemical releasers of social behavior-VIII. Citral in the mandibular gland secretion of *Lestrimelitta* limao (Hymenoptera: Apoidea: Melittidae). *Ann. ent. Sot. Am*, 59: 962-964.

Blum, M.S.; Crewe, R.M.; Kerr, W.E.; Keith, L.H.; Garrison, A.W. e Walker, M.M. 1970. Citral in stingless bees: isolation and functions in trail-laying and robbing. *Journal of Insect Physiology*, 16: 1637–1648.

Breed, M.D.; Cook, C. e Krasnec, M. O. 2012. Cleptobiosis in Social Insects. *Psyche*, Article ID 484765, doi:10.1155/2012/484765

Bohart, G.E. 1970. The Evolution of Parasitism Among Bees. *Utah State University, Logan, UT*

Camargo, J. M. F. & J. S. Moure. 1989. Duas espécies novas de *Lestrimelitta* Friese (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera) da região amazônica. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi, Série Zoologia*, 5: 195-212.

Cardinal, S.; Straka, J. e Danforth, B. N. 2011. Comprehensive phylogeny of apid bees reveals the evolutionary origins and antiquity of cleptoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37: 16207–16211

Cruz-landim, C. 2009. Abelhas: Morfologia e função de sistemas. *Fundação Editora da UNESP*, 1 ed., São Paulo, 416p.

Francke, W.; Lübke, G.; Schröder, W.; Reckziegel, A.; Imperatriz-fonseca, V.; Kleinert, A.; Engels, E. ; Hartfelder, K. ; Radtke, R.; Engels, W. 2000. Identification of oxygen containing volatiles in cephalic secretions of workers of Brazilian stingless bees. *J. Braz. Chem. Soc*., 11: 562-571

Grimaldi, D. & Engel, M.S. 2005. Evolution of the Insects, *Cambridge, Cambridge University Press.*

Holldobler, B. 1986. Food robbing in ants, a form of interference competition. *Oecologia*, 69:12-15

Iyengar, E. 2008. Kleptoparasitic interactions throughout the animal kingdom and a re-evaluation, based on participant mobility, of the conditions promoting the evolution of kleptoparasitism. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93:745–762.

Kerr, W. E. 1951. Bases para o estudo de genética de populações dos Hymenoptera em geral e dos Apinae sociais em particular. *Anales da Escola superior Agrícola "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo,* 8: 219-353

Krebs, J.R. e Davies, N.B. 1996. *Introdução à ecologia comportamental*. *São Paulo, Atheneu Editora,* 420 p.

Johnson, K. L. e Hubbel, S. P. 1974. Agression and competition amog Stingless Bees: Field Studies. *Ecology*, 55: 120-127

Michener, C. D. 1974. The social behavior of the bees: a comparative study. *Belknap Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts*.

Michener, C. D. 2000. The bees of the World. University of Kansas Natural History Museum and Department of Entomology. *The Johns Hopkins University Press Baltimore and London.*

Morgan, E.D. 1990. Preparation of small scale samples from insects for chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **236**: 227-235

Morgan, E.D. 2004. Biosynthesis in insects. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.*

Moure, J. S.; Nogueira-Neto, P.; Kerr, W. E. 1958. Evolutionary problems among Meliponinae (Hymenoptera, Apidae). *Proc. 10th Inter. Cong. Entomol., Montreal*, 2: 481- 493

Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. *Available at http://www.moure.cria.org.br/catalogue*.

Nogueira-Neto, P. 1970. Behavior problems related to the pillages made by some parasitic stingless bees (Meliponinae, Apidae). *Development and Evolution of Behavior. Essays in Memory of T.C. Schneirla:* 416-434.

Nunes, T. M.; Nascimento, F; Turatti, I ; Lopes, N ; Zucchi, R. 2008.Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? Animal Behaviour, v. 75, p. 1165-1171.

Richard, F. J. ; Dejean, A. ; Lachaud, J.P. 2004. Sugary food robbing in ants: a case of temporal cleptobiosis. *C. R. Biologies*, 327: 509-517

Roselino, A.C. 2005. Polinização em culturas de pimentão - *Capsicum annuum* por *Melipona quadrifasciata anthidioides* e *Melipona scutellaris* e de morango - *Fragaria x ananassa por Scaptotrigona aff. depilis* e *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP.

Roselino, A.C. ; Santos, S.B. ; Hrncir, M. ; Bego, L.R. 2009. Differences between the quality of strawberries (Fragaria x ananassa) pollinated by the stingless bees *Scaptotrigona aff. depilis* and *Nannotrigona testaceicornis*. *Genetics and Molecular Research*, 8: 539-545,

Ross, K. G. & Keller, L. 1995. Evolution of social organization: insights from fire ants and other highly eusocial insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26: 631-656.

Roubik, D.W. 1989. Ecology and natural history of tropical bees, *Cambridge, Cambridge University Press*, 514 p.

Roubik, D. W. 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37: 124-143.

Santos, S. A. B ; Roselino, A. C. ; Hrncir, M.; Bego, L. R. 2009. Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Genetics and Molecular Research*, 8: 751-757,

Santos, S. A. B.; Roselino, Ana Carolina; Bego, L. R. 2008. Pollination of Cucumber Cucumis sativus L. (Cucurbitales: Cucurbitaceae) by the Stingless Bees *Scaptotrigona aff. depilis* Moure and *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini). *Neotropical Entomology*, 37: 506-512.

Sakagami, S. F.; Laroca. S. 1963. Additional observations on the habits of the cleptobiotic stingless bees the genus *Lestrimelitta Friese*. *Journal of Faculty Science of Hokkaido University*, 15: 319-339.

Sakagami, S.F.; Roubik, D.W. e Zucchi, R. 1993. Ethology of the robber stingless bee, *Lestrimelitta limao* (Hymenoptera, Apidae). *Sociobiology*, 21: 237-277.

Schorkopf, D. L. P. ; Jarau, S. ; Francke, W.; Twele, R. ; Zucchi, R.; Hrncir, M. ; Schmidt, V. M. ; Ayasse, M. ; Barth, F. G. 2007. Spitting out information.

Trigona bees deposit saliva to signal resource locations. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 274: 898.

Schwarz, H. F. 1948. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 90: 1-546

Stangler, E. S.; Jarau, S.; Hrncir, M.; Zucchi, R. and Ayasse, M**.** 2009. Identification of trail pheromone compounds from the labial glands of the stingless bee *Geotrigona mombuca*. *Chemoecology*, **19**: 13-19

van Zweden, J. S.; Grüter, C.; Jones, S. M.; Ratnieks, F. L.W. 2011. Hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* increase colony defensive perimeter as shown by intra and inter-specific comparisons. *Behaviour Ecology and Sociobiolgy*, 65:1277–1282

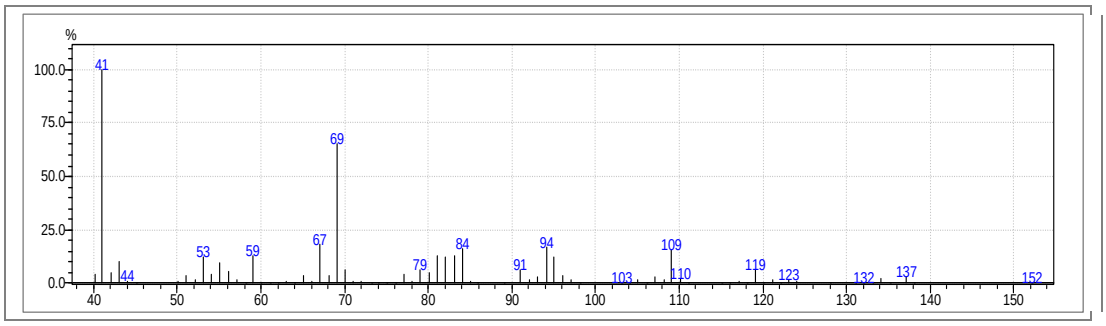
Wilson, E. O. 1971. The insect societies. *Belknap Press. Harvard University Press. Massachusetts*, 548p.

Wittmann, D. 1985. Aerial defense of the nest by workers of the stingless bee *Trigona (Tetragonisca) angustula* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae). *Behaviour Ecology and Sociobiology*, 16:111-114.

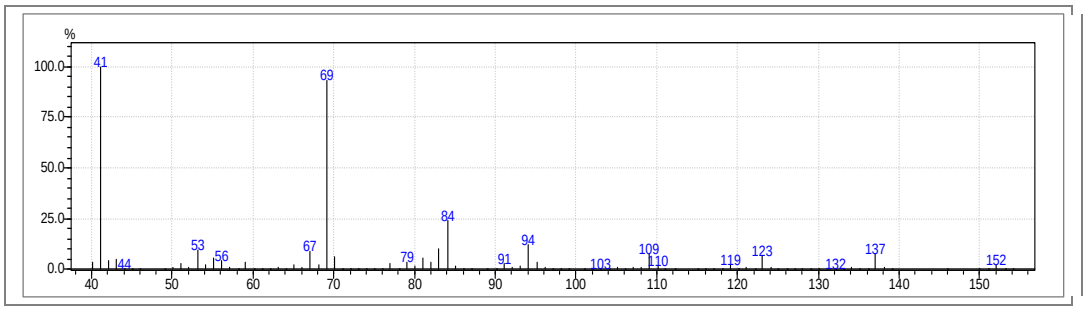
Wittmann, D.; Radtke, R.; Zeil, J.; Lubke, G. and Francke, W. 1990. Robber bees *(Lestrimelitta limao)* and their host chemical and visual cues in nest defense by Trigona (Tetragonisca) angustula (Apidae: Meliponinae). *Journal of Chemical Ecology*, 16:631-641.

Apêndice

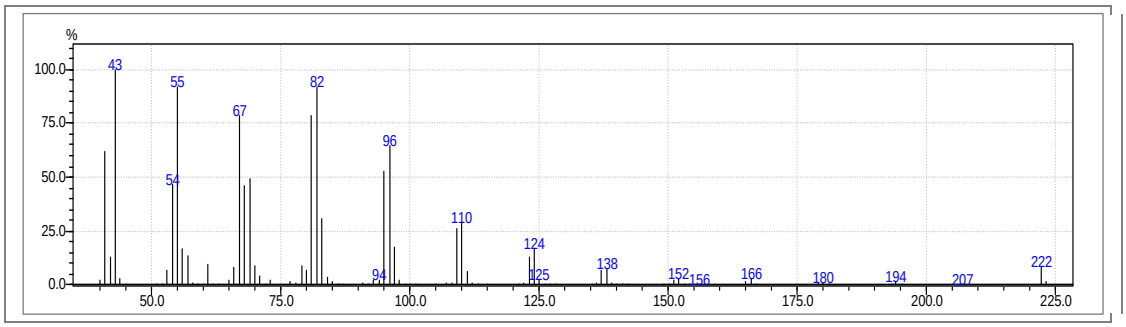
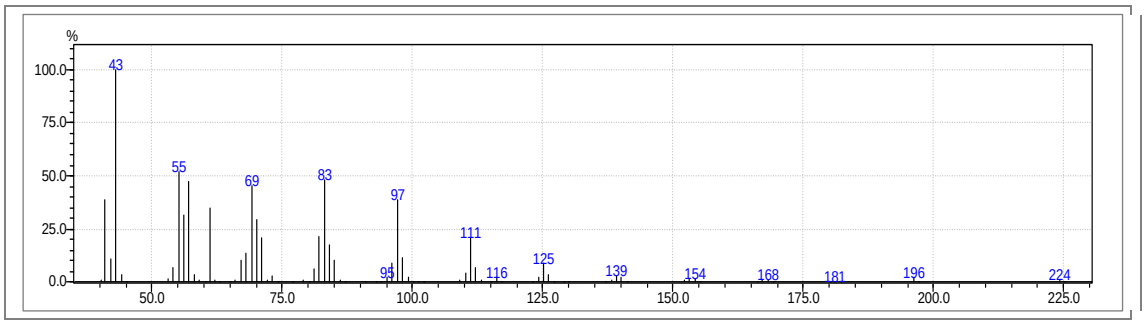
Espectro 1- Neral



Espectro 2- Geranial



Espectro 3- Acetato de 9-hexadecenila



Espectro 4- Acetato de hexadecila