



Pós-Graduação
ZOOLOGIA
MPEG/UFPA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
MUSEU PARAENSE EMILIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM ZOOLOGIA**

**APTIDÃO REPRODUTIVA E ACASALAMENTOS EM CONDIÇÕES ARTIFICIAIS
NA ABELHA SEM FERRÃO *Melipona flavolineata* Friese
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)**

Jamille Costa Veiga

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Curso de Mestrado da Universidade Federal do Pará e do Museu Paraense Emílio Goeldi, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Andrés León Contrera
(UFPA/ICB)

Co-orientador: Dr. Cristiano Menezes
(EMBRAPA)

BELÉM-PA

2015

JAMILLE COSTA VEIGA

**APTIDÃO REPRODUTIVA E ACASALAMENTOS EM CONDIÇÕES ARTIFICIAIS
NA ABELHA SEM FERRÃO *Melipona flavolineata* Friese
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Curso de Mestrado da Universidade Federal do Pará e do Museu Paraense Emílio Goeldi, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zoologia.

Orientador: Dr. Felipe Andrés León Contrera (UFPA/ICB)
Co-orientador: Dr. Cristiano Menezes (EMBRAPA)

BELÉM-PA

2015

JAMILLE COSTA VEIGA

**APTIDÃO REPRODUTIVA E ACASALAMENTOS EM CONDIÇÕES ARTIFICIAIS
NA ABELHA SEM FERRÃO *Melipona flavolineata* Friese
(HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Curso de Mestrado da Universidade Federal do Pará e do Museu Paraense Emílio Goeldi, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zoologia.

Prof. Dr. Felipe Andrés León Contrera
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA
(Orientador)

Dr. Cristiano Menezes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA
(Co-orientador)

Dra. Denise Araujo Alves
Universidade de São Paulo, USP

Prof. Dr. Breno Magalhães Freitas
Universidade Federal do Ceará, UFC

Prof. Dr. Lúcio Antônio de Oliveira Campos
Universidade Federal de Viçosa, UFV

Prof. Dr. Helder Lima de Queiroz
Instituto Mamirauá, MCT

Dra. Anita Roberta Stone
Michigan State University

Belém, Março de 2015

“Enquanto fiquei ali, na escuridão crescente, pensei que com essa simples *hipótese* eu havia decifrado o enigma daquele mundo, decifrado todo o segredo daquele povo tão simpático. Talvez, as medidas que eles tinham desenvolvido para conter a explosão populacional tivessem funcionado além do previsto, tendo como resultado a diminuição da população, ao invés de mantê-la estacionária. Isso explicaria as ruínas abandonadas. Minha *hipótese* era bastante simples, bastante plausível – como aliás acontece com a maior parte das *hipóteses* equivocadas.”

Viajante no Tempo em “A Máquina do Tempo” - H. G. Wells, 1895.

(Obs: Na tradução do livro, consta a palavra *teoria* no lugar de *hipótese*. Considerei minha substituição mais adequada à natureza do trabalho.)

“O enorme volume de publicações científicas atuais sugere que a maioria de nós provavelmente está errada na maior parte do tempo, embora alguns equívocos possam desempenhar um papel criativo na pesquisa. Mesmo lutando para estarmos certos, vamos fazer uma pausa para admirar a grande arte de ser produtivamente errado.”

Kaiser & Creager em “O jeito certo de errar” - Scientific American, Julho de 2012.

Agradecimentos

Agradeço a todos que me ajudaram a realizar o presente trabalho! A seguir, uma singela listagem daqueles que me permitiram iniciar, dar continuidade e concluir a minha dissertação de mestrado. Meus imensuráveis agradecimentos à:

Auriel Costa, Jorge Veiga, Jéssica Veiga (e Mabel), minha pequena grande família, que compreende o meu trabalho, me incentiva e vibra comigo a cada passo que dou em minha carreira.

Felipe Contrera e Cristiano Menezes, meus orientadores e grandes amigos, agradeço por tudo. Tudo mesmo!

Ayrton Vollet Neto, pela revisão crítica (e voluntária, eu espero) do meu trabalho.

Aline Borba, Gláucia Mecca e Ayrton Vollet Neto (de novo!), por me acolherem em Ribeirão Preto, nos diferentes momentos (sempre de última hora) em que precisei ir até lá para aprender coisas novas!

André Sá, Lucas von Zuben e Sidnei Mateus, por me ensinarem novas técnicas. Por mais que algumas não façam parte do presente trabalho, elas me ajudaram a enxergar as interações das abelhas sob outra perspectiva. Uma delas foi essencial para a execução dos experimentos. Muito obrigada!

Kamila Leão, Ana Carolina Queiroz e Joyce Teixeira, minhas amigas, companheiras de laboratório e colegas de profissão. Simplesmente agradeço por tudo que tem nos acontecido até o momento. A nossa jornada continua! Agradeço por continuarmos juntas.

Kateanne Lira e Rodriga Silva, estagiárias do laboratório (iniciação científica e TCC, respectivamente), que muito me auxiliaram na manutenção dos experimentos, em especial quando tive que fazer viagens e ministrar cursos. E à **Renata Reis** (do estágio obrigatório) que, mesmo passando pouco tempo no laboratório, foi essencial na confecção do mini-estúdio para a gravação dos acasalamentos.

Epifânia de Macêdo, doutoranda da Universidade Federal do Ceará, minha amiga e colega de profissão, que muito me ajudou nos meses de julho e agosto de 2014. Sua companhia e dedicação foram essenciais. Espero tê-la ajudado tanto quanto me ajudou.

Todos que, em algum momento, caíram no conto e tiveram que me acompanhar no laboratório durante os fins de semanas, feriados e jogos do Brasil. E também àqueles que foram por vontade própria, claro!

Janete Teixeira Gomes, técnica do Projeto de Educação Ambiental, pelos cuidados com as colmeias do nosso laboratório.

Milton José de Paula, meu namorado, pelas discussões, pelo apoio, companheirismo e cumplicidade enquanto paríamos nossas dissertações!

A todos que contribuíram diretamente, ou indiretamente com esse trabalho, meus sinceros e eternos agradecimentos!

Sumário

LISTA DE FIGURAS -----	VI
LISTA DE TABELAS -----	VIII
INTRODUÇÃO GERAL -----	2
QUEM SÃO AS ABELHAS SEM FERRÃO? -----	2
BIOLOGIA DAS ABELHAS SEM FERRÃO -----	3
APTIDÃO REPRODUTIVA E COMPORTAMENTO REPRODUTIVO DOS MELIPONÍNEOS -----	5
O CONTROLE DA REPRODUÇÃO EM ABELHAS SEM FERRÃO -----	8
ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS E OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO -----	9
REFERÊNCIAS -----	12
CAPÍTULO 1: MATURIDADE SEXUAL E INÍCIO DO COMPORTAMENTO DE VOO EM MACHOS DA ABELHA SEM FERRÃO <i>MELIPONA FLAVOLINEATA</i> FRIESE (APIDAE, MELIPONINI) -----	18
RESUMO -----	18
ABSTRACT -----	19
INTRODUÇÃO -----	20
MATERIAL E MÉTODOS -----	22
RESULTADOS -----	26
DISCUSSÃO -----	32
REFERÊNCIAS -----	37
CAPÍTULO 2: ATRATIVIDADE SEXUAL DE RAINHAS VIRGENS DE <i>MELIPONA FLAVOLINEATA</i> FRIESE (APIDAE, MELIPONINI) EM DIFERENTES IDADES E A IMPORTÂNCIA DO CONTEXTO SOCIAL -----	42
RESUMO -----	42
ABSTRACT -----	44
INTRODUÇÃO -----	45
MATERIAL E MÉTODOS -----	48
RESULTADOS -----	54
DISCUSSÃO -----	58
REFERÊNCIAS -----	63
CAPÍTULO 3: ACASALAMENTOS EM CONDIÇÕES ARTIFICIAIS E O CONTROLE DA CÓPULA POR RAINHAS VIRGENS NA ABELHA SEM FERRÃO <i>MELIPONA FLAVOLINEATA</i> (APIDAE, MELIPONINI) -----	67
RESUMO -----	67

ABSTRACT	69
INTRODUÇÃO	70
MATERIAL E MÉTODOS	72
RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	84
REFERÊNCIAS	89
DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
REFERÊNCIAS	96

Lista de figuras

Introdução geral

- Figura 1 - Fêmeas reprodutivas de *Melipona flavolineata* apresentadas em duas fases do seu ciclo de vida, rainha virgem (a) e rainha fisogástrica (b), respectivamente antes e depois do acasalamento (indicadas pelas setas amarelas). Fotos: Cristiano Menezes. -----4
- Figura 2 – Operárias de *Melipona flavolineata* desempenhando comportamento de formação de corte ao redor de uma rainha virgem dominante (indicada pelo círculo branco), com abdome inflado. Foto: Cristiano Menezes. -----7

Capítulo 1

- Figura 1 – Feixe de espermatozoides nas vesículas seminais de machos de *Melipona flavolineata* (aproximadamente 50 células aglomeradas). Aumento: 400x. Foto: Jamille Veiga. -----27
- Figura 2 – Número estimado de espermatozoides nas vesículas seminais de machos de *Melipona flavolineata* pertencentes a diferentes idades. O ponto central indica a mediana, o boxplot representa 25% - 75% do conjunto de dados, e a barra vertical informa os valores mínimo e máximo de cada categoria. As letras indicam diferenças significativas entre as categorias ao nível de 5%. -----29

Capítulo 2

- Figura 1 – a) Rainhas virgens recém-emergidas de *Melipona flavolineata* acondicionadas em placa de Petri com acesso *ad libitum* a pólen e mel; b) Exemplo do sistema de acondicionamento de abelhas em minicolônia confinada. Fotos: Epifânia de Macêdo (a), Jamille Veiga (b). -----50
- Figura 2 – a) Macho de *Melipona flavolineata* após tentativa de cópula, apresentando o endófalo evertido (genitália liberada), indicado pela seta; b) Endófalos liberados e perdidos por machos, sobre o chão da arena de cópula. Fotos: Cristiano Menezes. -----51
- Figura 3 – Atratividade de rainhas virgens de *Melipona flavolineata*, medida em número de eversões de machos, em diferentes idades. O ponto central e o box-plot indicam a mediana e a variação das amostras numa faixa de 25% a 75%. A linha vertical representa

os limites das amostras (com exceção dos outliers), e o círculo vazado, os valores dos outliers. As letras indicam diferenças significativas entre os ranks das categorias de idade, a um nível de significância de 5%. -----56

Figura 4 – Atratividade sexual (medida em número de eversões de machos maduros) de rainhas virgens de *M. flavolineata* com 06 dias de idade, pertencentes a diferentes contextos sociais. C1: Rainha virgem sozinha em placa de Petri; C2: Rainha virgem acompanhada de 10 operárias jovens em placa de Petri; C3: Rainha virgem acompanhada de outra rainha virgem em placa de Petri; C4: Duas rainhas virgens acompanhadas de 10 operárias jovens em placa de Petri; C5: Rainha virgem em contexto de minicolônia; C6: Duas rainhas virgens em contexto de minicolônia. O ponto central e o box-plot indicam a mediana e a variação das amostras numa faixa de 25% a 75%, respectivamente. A linha vertical representa os limites máximo e mínimo das amostras. As letras indicam diferenças significativas entre os ranks das categorias ao nível de 5%. -----57

Capítulo 3

Figura 1 – Rainha virgem de *Melipona flavolineata*, indicada pela seta, sendo induzida à narcose através da exposição ao fluxo de CO₂, que passa através do tubo transparente sem cor. A rainha encontra-se dentro do tubo transparente azul, que contém um pequeno orifício na extremidade mais fina, por onde flui a corrente de CO₂. Foto: Jamille Veiga. -----75

Figura 2 – Representação do teste de acasalamento na espécie *Melipona flavolineata*, utilizando dez machos sexualmente maduros, e uma rainha virgem, em arena de cópula confinada.-----76

Figura 3 – Representação do teste de acasalamento de *Melipona flavolineata* realizado em campo, próximo a uma agregação reprodutiva. A seta indica uma rainha virgem sendo ofertada, a aproximadamente a um metro de distância (linha tracejada) do agregado de machos (indivíduos aglomerados no Meliponário), sobre uma lona estendida no solo. --77

Figura 4 – a) Tentativas de cópula em *Melipona flavolineata*, com eversão da genitália masculina; b) Cópula efetiva, na qual o macho introduziu com sucesso o seu endófalco na rainha virgem narcotizada c) Macho com endófalco evertido; d) Rainha virgem inerte após exposição ao CO₂. Fotos: Cristiano Menezes. -----80

Lista de tabelas

Capítulo 1

- Tabela 1 - Descrição dos diferentes tratamentos de contextos sociais em que foram mantidos confinados, durante 15 dias, os machos de *Melipona flavolineata*. ----- 25
- Tabela 2 – Número estimado de espermatozoides de 55 machos de *Melipona flavolineata* pertencentes a diferentes categorias de idade, acondicionados em minicolônias confinadas. ----- 28
- Tabela 3 – Variação da estimativa do número de espermatozoides presentes nas vesículas seminais de machos de *Melipona flavolineata*. Os indivíduos foram mantidos em diferentes contextos sociais, em confinamento, durante 15 dias. ----- 31

Capítulo 2

- Tabela 1 – Descrição dos tratamentos correspondentes aos diferentes níveis de contexto social, em que foram mantidas as rainhas virgens de *Melipona flavolineata* durante seis dias após a emergência.----- 53

Capítulo 3

- Tabela 1 – Número de tentativas (eversões dos machos) e cópulas bem sucedidas com rainhas virgens de *Melipona flavolineata* em condições normais ou inertes (narcotizadas pelo uso de CO₂).----- 81
- Tabela 2 – Número de tentativas (eversões dos machos) e cópulas bem sucedidas com rainhas virgens de *Melipona flavolineata* em arenas de cópula e no agregado reprodutivo.----- 83

INTRODUÇÃO GERAL

Quem são as abelhas sem ferrão?

Devido a uma íntima relação com as flores, e notável diversidade, as abelhas sem ferrão são consideradas um importante grupo de insetos polinizadores, em especial da flora nativa pertencente a sua área de ocorrência natural (Roubik, 1992; Wilms, 1996; Ramalho et al., 2004). As abelhas sem ferrão, também chamadas de meliponíneos, são insetos eussociais (Wilson, 1971; Lin & Michener, 1972), com ferrão atrofiado (Michener, 2007), e distribuem-se por toda a Zona Tropical e Subtropical do mundo, com exceção das Ilhas do Pacífico (Camargo & Pedro, 2007; Rasmussen, 2008; Eardley et al., 2009). As 500 espécies conhecidas para esse grupo fazem parte da tribo Meliponini (Hymenoptera, Apidae) (Michener, 2013), na qual estão inclusas abelhas de variados tamanhos, formas, cores e repertórios comportamentais (Michener, 2007; 2013).

A criação das abelhas sem ferrão é conhecida como meliponicultura (Nogueira-Neto, 1997) uma atividade econômica realizada para diversos fins. O principal produto gerado atualmente é o mel (Vit et al., 2013), uma substância açucarada que tem sido explorada há séculos por povos tradicionais no continente americano (Posey, 1983; Camargo & Posey, 1990). Existem outros produtos, também merecedores de atenção, e que apresentam potencial para serem comercialmente explorados, a exemplo do pólen (Menezes et al., 2012) e do própolis (Liberio et al., 2011; Cunha et al., 2013). Nesse contexto, surgem produtos secundários ou serviços, como a utilização das abelhas sem ferrão na educação ambiental e no lazer (Freitas et al., 2007).

Nos últimos anos, o produto que vem ganhando notável importância são as próprias colônias. A meliponicultura encontra-se num momento em que grande número de colônias é necessário, frente às demandas do mercado, em especial o da polinização agrícola (Cortopassi-Laurino, 2006; Contrera et al., 2011; Venturieri et al., 2012). Através da massiva produção de novos ninhos será possível alimentar tal mercado. A produção em larga escala de colônias ainda não é uma realidade para as abelhas sem ferrão, mas existem bons exemplos a serem seguidos, como o caso da

produção de colônias de abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e de abelhas mamangavas (*Bombus terrestris*), ambas direcionadas para o mercado da polinização de culturas agrícolas em todo o mundo (Seeley, 1985; 2009; Velthuis, 2002; Velthuis & Van Doorn, 2006).

Biologia das abelhas sem ferrão

Os meliponíneos formam colônias perenes, geralmente instalando seus ninhos em cavidades pré-existentes (e. g. troncos de árvores ou ninhos abandonados de outros animais). Nele, armazenam grandes somas de alimentos em potes de pólen e de mel, e mantêm protegidas a sua prole (Sakagami, 1982; Roubik, 2006). A sociedade dessas abelhas se compõe de fêmeas, originadas de ovos fecundados (diploides), e machos, provenientes de ovos não fecundados (haploides) (Wilson, 1971; Heimpel & De Boer, 2008).

As fêmeas são distribuídas em duas castas, as operárias e as rainhas (virgens ou fecundadas). As operárias, em geral, são fêmeas estéreis, e são responsáveis por todas as tarefas de manutenção do ninho, como cuidado com a prole, coleta e estoque de recursos, defesa, termorregulação, limpeza (Sakagami, 1982; Wille, 1983; Michener, 2007). A rainha, por sua vez, é a fêmea responsável pela reprodução, cabendo a ela a função de realizar o voo nupcial e a postura. A rainha virgem, em consequência da fecundação e do subsequente desenvolvimento do abdome, se torna fisogástrica (Kerr et al., 1962; Silva et al., 1972) (Figura 1).



Figura 1 - Fêmeas reprodutivas de *Melipona flavolineata* apresentadas em duas fases do seu ciclo de vida, rainha virgem (a) e rainha fisogástrica (b), respectivamente antes e depois do acasalamento (indicadas pelas setas amarelas). Fotos: Cristiano Menezes.

Nessas abelhas, as castas femininas são produzidas através de dois sistemas: a) sistema de determinação de castas alimentar-quantitativo; e b) sistema de determinação de castas genético-alimentar (Kerr, 1950; Camargo, 1972a; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). No primeiro sistema, a produção de rainhas virgens é regulada pelas operárias que, ao decidirem a quantidade de alimento que uma larva feminina terá acesso durante seu desenvolvimento, determinam se dela irá emergir uma operária ou uma rainha (Kerr, 1948; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). No segundo, a produção de rainhas foge ao controle das operárias, uma vez que o fenótipo da larva feminina depende mais de fatores genéticos, do que da quantidade de alimento recebido (Kerr, 1950; Ratnieks, 2001; Wenseleers & Ratnieks, 2004; Hartfelder et al., 2006). Esse sistema é exclusivo de apenas um grupo dentro das abelhas sem ferrão, o gênero *Melipona*.

Devido ao tipo de sistema de determinação de castas em *Melipona*, as espécies pertencentes a esse gênero apresentam a peculiar característica de produzir rainhas virgens em grandes quantidades. Fora a extensa literatura que busca explicar essa excessiva produção (Kerr, 1950; Koedam et al., 1995; Ratnieks, 2001; Wenseleers et al., 2004; Wenseleers & Ratnieks, 2004; Hartfelder et al., 2006), fato é que as rainhas

virgens são mortas pelas operárias, na maioria das vezes (Koedam et al., 1995; Jarau et al., 2009; Kärcher et al., 2013).

A eliminação das rainhas está diretamente relacionada à presença de uma rainha fisogástrica (Koedam et al., 1995; Kärcher et al., 2013). Contudo, quando não são eliminadas, as rainhas virgens podem seguir três destinos alternativos: a substituição da rainha fisogástrica (Kerr et al., 1962; Koedam et al., 1995; Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995; Jarau et al., 2009), a enxameação para fundar um novo ninho (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990; Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995; Van Veen & Sommeijer, 2000), ou o parasitismo reprodutivo de um ninho não-natal da mesma espécie (Sommeijer et al., 2003; Wenseleers et al., 2011; Van Oystaeyen et al., 2013). Todos os destinos resultam no propósito maior da vida de uma rainha, que é a reprodução.

Os machos (ou zangões), juntamente com as rainhas virgens, são responsáveis pela reprodução. Esses indivíduos podem ser produzidos por rainhas fisogástricas, quando estas escolhem não fecundar determinados óvulos (por um mecanismo ainda não compreendido; Cruz-Landim, 2009); ou por operárias, quando estas conseguem desenvolver seus ovários, e assim gerar ovos funcionais que, por não serem fertilizados, darão origem a machos (Sakagami et al., 1963; Beig, 1972). Apesar de sua origem, fato é que os machos são indivíduos que pouco contribuem para a manutenção da colmeia, mas dela se utilizam para se tornarem maduros. Ao atingirem a maturidade, abandonam permanentemente o ninho (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990; Van Veen et al., 1997).

Aptidão reprodutiva e comportamento reprodutivo dos meliponíneos

Apesar da ampla diversidade, todas as espécies de meliponíneos são monândricas (Peters et al., 1999; Strassmann, 2001; Jaffé et al., 2014). Significa, portanto, que uma rainha virgem acasala somente com um macho, ambos, uma única vez. Quando o acasalamento é bem-sucedido, o macho libera o endófalco (ou cápsula genital) para fora do seu abdome, introduzindo-o na rainha e deixando-o preso na câmara vaginal da mesma (Kerr et al., 1962; Silva et al., 1972; Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995). Após o acasalamento, os machos que copularam com sucesso morrem

dentro de alguns dias (Engels & Engels, 1988; Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990). As rainhas recém-copuladas retornam aos seus ninhos, onde irão desenvolver o abdome e iniciar a postura. Assim, para que essa sucessão de eventos ocorra (cópula – fecundação – ativação da postura), é necessário que tanto as rainhas quanto os machos estejam reprodutivamente *aptos*¹ para o acasalamento.

As rainhas virgens emergem sexualmente maduras, com o aparelho reprodutor pronto para a fecundação (Cruz-Landim, 2009). Entretanto, o desenvolvimento da atratividade sexual das mesmas se dá ao longo da vida adulta (Engels & Engels, 1988; Van Veen et al., 1999), de forma que, ao saírem das células de cria, ainda não estão comportamentalmente aptas a copular, embora estejam fisiologicamente prontas para tal. Com o avanço da idade, as rainhas iniciam a produção e a liberação de feromônios sexuais (Engels et al., 1993; 1997), e ocorrem ainda modificações nos tecidos do aparelho reprodutor (Martins & Serrão, 2004; Serrão et al., 2011).

As modificações fisiológicas das rainhas, embora internas, podem ser detectadas através do seu comportamento, o qual é capaz de gerar respostas comportamentais específicas em machos e operárias (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995; Van Veen et al., 1999; Jarau et al., 2009). Os machos podem ser altamente estimulados, chegando a tentar copular com elas, mesmo fora do contexto de um voo nupcial (Camargo, 1972b; Sakagami & Laroca, 1963; Engels & Engels, 1988; Campos & Melo, 1990); enquanto as operárias podem se mostrar altamente agressivas, e eliminá-las; ou ainda podem protegê-las, alimentá-las e realizar o comportamento de corte ao redor delas (Koedam et al., 1995; Jarau et al., 2009; Kärcher et al., 2013) (Figura 2).

¹ *A palavra **aptidão** significa *tendência, capacidade natural ou adquirida, para realizar algo* (Houaiss, 2001). Com base nisso, consideramos nesse trabalho a expressão *aptidão reprodutiva*, como a capacidade adquirida por um indivíduo de realizar a cópula, no sentido de possuir os requisitos necessários para tal. Sendo assim, a aptidão reprodutiva envolve diferentes traços do desenvolvimento e da história de vida dos organismos, a exemplo da maturidade, da capacidade de voo, da atratividade e da receptividade sexual (aspectos investigados nesse trabalho).



Figura 2 – Operárias de *Melipona flavolineata* desempenhando comportamento de formação de corte ao redor de uma rainha virgem dominante (indicada pelo círculo branco), com abdome inflado. Foto: Cristiano Menezes.

Os machos, por sua vez, não emergem sexualmente maduros. A migração dos espermatozoides dos testículos para as vesículas seminais se inicia após a emergência do adulto e, ao final da migração, o indivíduo é considerado sexualmente maduro (Camargo, 1984; Cruz-Landim & Dallacqua, 2002; Araújo et al., 2005). O tempo necessário para a maturidade sexual dos machos varia de acordo com a espécie. Enquanto ainda são imaturos, despigmentados e incapazes de voar, os machos permanecem dentro dos ninhos (Van Veen et al., 1997). Assume-se que deixam o ninho somente após se tornarem reprodutiva e comportamentalmente aptos, quando estarão prontos para viver fora dos ninhos. Nesse ambiente externo, os machos formam agregações reprodutivas (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990; Sommeijer & Bruijn, 1995; Cortopassi-Laurino, 2007). Essas agregações consistem de dezenas a centenas de machos reunidos em um local, onde aguardam a chegada das rainhas (Sommeijer & Bruijn, 1995; Van Veen & Sommeijer, 2000).

Uma vez que a maturidade sexual dos machos e a atratividade das rainhas se dão ao longo da vida adulta e dentro dos ninhos, espera-se que fatores associados à idade, bem como ao contexto colonial, tenham influência no desenvolvimento da aptidão

reprodutiva desses indivíduos. Esses fatores são importantes para entendermos as diferentes estratégias adotadas por machos e rainhas virgens, quando estes ainda se encontram na segurança da colmeia. As decisões tomadas podem ter consequências tanto para o seu objetivo final, que é realizar o acasalamento, como para a colônia, que é gerar novas unidades (colônias-filhas). Além disso, entender como os sexuais se tornam aptos para copular é particularmente importante quando o objetivo é realizar acasalamentos em condições controladas (Camargo, 1972b, 1976; Engels & Engels, 1988).

O controle da reprodução em abelhas sem ferrão

As técnicas de controle da reprodução de abelhas surgiram como métodos para estudar o comportamento reprodutivo em condições artificiais (Frison, 1927; Garófalo, 1974), e para testar hipóteses sobre diferentes cenários reprodutivos, por exemplo, a consequência dos endocruzamentos (Camargo, 1976). O aprimoramento dessas técnicas resultou dos estudos de melhoramento genético em *A. mellifera* (Mackensen, 1951; Woyke, 1962), e da necessidade de se ter colônias de *B. terrestris* disponíveis ao longo de todo o ano, independente da estação (Velthuis, 2002; Velthuis & Van Doorn, 2006). Tais técnicas permitiram acelerar uma das etapas do processo de fundação de novas colônias, a reprodução no nível dos indivíduos, impulsionando a produção de colônias em larga escala.

Um bom exemplo é o sistema de produção em larga escala de ninhos da espécie *Bombus terrestris*. Essa é uma abelha primitivamente eussocial, considerada uma importante polinizadora de culturas agrícolas, dentre elas o tomate (Velthuis, 2002; Velthuis & Van Doorn, 2006). Atualmente, cerca de um milhão de colônias são produzidas e comercializadas anualmente. A cadeia produtiva conta com métodos bem estabelecidos para a alimentação artificial das abelhas, o acondicionamento adequado das colônias em confinamento e o controle da etapa reprodutiva. A eficiência e a rentabilidade da produção de colônias de *B. terrestris* é, sem dúvida, o que almeja atualmente a meliponicultura (Venturieri et al., 2012; Menezes et al., 2013).

Nas abelhas sem ferrão, poucos foram os trabalhos voltados para o controle da reprodução de fato. Na maioria dos estudos, a técnica de acasalamento em confinamento, na qual machos e fêmeas são confinados em um recipiente até que ocorra a cópula, foi utilizada como um método para testar hipóteses. A partir de acasalamentos controlados com a espécie *M. quadrifasciata* foi possível estudar, por exemplo, os efeitos do endocruzamento nas colônias, comparar machos diploides e haploides, a ativação do ovário de rainhas recém-acasaladas e as modificações no seu aparelho reprodutor (Camargo, 1972; Campos & Melo, 1990; Bezerra, 1995; Melo et al., 2001; Martins & Serrão, 2004).

Contudo, esses estudos foram pontuais, centrados em apenas uma espécie, deixando ainda lacunas no conhecimento básico sobre a reprodução dessas abelhas. Considerando que o controle da reprodução é uma ferramenta de interesse para a pesquisa, a comercialização e a conservação dos meliponíneos, é importante testar a técnica de cópula em condições artificiais em outras espécies dessa Tribo.

Organização dos capítulos e objetivos da dissertação

O objetivo geral dessa dissertação foi estudar aspectos da aptidão reprodutiva de machos e rainhas virgens, e testar a realização de acasalamentos em condições artificiais numa espécie de abelha sem ferrão, *Melipona flavolineata*. A espécie alvo desse estudo é conhecida popularmente como uruçú-amarela e tem distribuição restrita ao Brasil (Silveira et al., 2002; Pedro, 2014). Nessa espécie encontramos características desejáveis para a condução dos experimentos, servindo aos nossos propósitos, sendo elas: a abundante produção de rainhas virgens (como em outras *Melipona*; Wenseleers et al., 2004; Santos-Filho et al., 2006) e a aglomeração de machos, sempre próxima às colônias e, muitas vezes, à entrada das mesmas (observação pessoal). Tendo machos e rainhas em grandes quantidades, *M. flavolineata* nos provou ser um excelente modelo experimental para testar diferentes questões associadas à biologia reprodutiva das abelhas sem ferrão, bem como questões exclusivas dessa espécie.

Além disso, *M. flavolineata* é comercialmente relevante no nordeste do estado do Pará, por ser considerada boa produtora de mel (Magalhães & Venturieri, 2010), e por apresentar grande potencial como agente polinizador de culturas agrícolas, como a cultura do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (Venturieri et al., 2005; dados não publicados). Devido à sua importância, entendemos que avanços no manejo dessa espécie se fazem necessários. Dentre outros tópicos, estudar os aspectos da biologia reprodutiva, focando aqueles que permitam o controle da reprodução dessa espécie, pode contribuir para avanços teóricos e práticos.

Concentramo-nos, especificamente, em responder às seguintes perguntas:

- a) Em que idade e sob quais contextos sociais os machos de *M. flavolineata* se tornam aptos para o acasalamento?
- b) Em que idade e sob quais contextos sociais as rainhas virgens de *M. flavolineata* se tornam aptas para o acasalamento?
- c) É possível realizar acasalamentos de *M. flavolineata* em condições artificiais?

Dessa forma, a dissertação foi organizada em três capítulos, cujos objetivos são apresentados a seguir.

- **Capítulo 1:** Maturidade sexual e o início do comportamento de voo em machos da abelha sem ferrão *Melipona flavolineata* Friese (Apidae, Meliponini)

Nesse primeiro capítulo, tivemos como objetivo investigar em que idade se completa a maturação sexual dos machos de *M. flavolineata*, e se esta é afetada por diferentes contextos sociais vivenciados pelos machos durante a fase adulta. Investigamos, ainda, em que idade se inicia o comportamento de voo nesses indivíduos, como parte dos requisitos para alcançar a aptidão reprodutiva.

- **Capítulo 2:** Atratividade sexual de rainhas virgens de *Melipona flavolineata* Friese (Apidae, Meliponini) em diferentes idades e a importância do contexto social

No segundo capítulo, nosso objetivo foi investigar em que idade e sob quais contextos sociais as rainhas virgens de *M. flavolineata* se tornam sexualmente

atrativas. Também foi possível acompanhar o desenvolvimento da receptividade sexual nessas rainhas.

- **Capítulo 3:** Acasalamentos em condições artificiais e o controle da cópula por rainhas virgens de *Melipona flavolineata* Friese (Apidae, Meliponini)

Nesse último capítulo, objetivamos testar a realização de acasalamentos de machos e rainhas virgens de *M. flavolineata* em condições artificiais. Adicionalmente, testamos a hipótese de que as rainhas virgens são capazes de decidir sobre a ocorrência das cópulas.

Referências

- ARAÚJO, V.A., ZAMA, U., DOLDER, H. & LINO-NETO, J. (2005) Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal of Morphological Science*, 22, 137–141.
- BEIG, D. (1972) Production of males in queenright colonies of *Trigona (Scaptotrigona) postica*. *Journal of Apicultural Research*.
- BEZERRA, J.M.D. (1995) Aspectos da reprodução de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Universidade Federal de Viçosa.
- CAMARGO, C.A. (1972a) Determinação de Castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 32, 133–138.
- CAMARGO, C.A. (1972b) Mating of the social bee *Melipona quadrifasciata* under controlled conditions (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 45, 520–523.
- CAMARGO, C.A. (1976) Determinação do sexo e controle da reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Universidade de São Paulo.
- CAMARGO, C.A. (1984) Spermatozoa numbers and migration to the seminal vesicle in haploid and diploid males of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier. *Journal of Apicultural Research*, 23, 15–17.
- CAMARGO, J.M.F. & PEDRO, S.R.M. (2007) Meliponini Lepeletier, 1836. In *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region* (ed M.G.A.R. Moure J.S., Urban D.), p. xiv+1058. Sociedade Brasileira de Entomologia, Curitiba, Brasil.
- CAMARGO, J.M.F. & POSEY, D.A. (1990) O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponidae, Apidae, Hymenoptera): notas adicionadas. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi*, 6, 17–42.
- CAMPOS, L.A.O. & MELO, G.A.R. (1990) Physogastric-queen mating in *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Genética*, 13, 491–500.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. (2007) Drone congregations in Meliponini: What do they tell us? *Bioscience Journal*, 23, 153–160.
- CRUZ-LANDIM, C. (2009) Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas. p. 408. Editora UNESP, São Paulo.
- CRUZ-LANDIM, C. & DALLACQUA, R.P. (2002) Testicular reabsorption in adult males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Cytologia*, 67, 145–151.

- CUNHA, M.G. DA, FRANCHIN, M., GALVÃO, L.C. DE C., RUIZ, A.L.T.G. DE, CARVALHO, J.E. DE, IKEGAKI, M., ET AL. (2013) Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 23.
- EARDLEY, C., GIKUNGU, M. & SCHWARZ, M. (2009) Bee conservation in Sub-Saharan Africa and Madagascar: diversity, status and threats. *Apidologie*, 40, 355-366.
- ENGELS, E. & ENGELS, W. (1988) Age-dependent queen attractiveness for drones and mating in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Journal of Apicultural Research*, 27, 3–8.
- ENGELS, E., ENGELS, W., LÜBKE, G., SCHRÖDER, W. & FRANCKE, W. (1993) Age-related patterns of volatile cephalic constituents in queens of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* Latr (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 24, 539–548.
- ENGELS, W., ENGELS, E. & FRANCKE, W. (1997) Ontogeny of cephalic volatile patterns in queens and mating biology of the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 31, 251–256.
- ENGELS, W. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (1990) Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In *Social Insects* pp. 167–230. Springer Berlin Heidelberg.
- FREITAS, G.S. DE, SANTANA, W.C., AKATSU, I.P. & SOARES, A.E.E. (2007) Abelhas para a melhoria: curso de meliponíneos, alfabetização técnica para a conservação. *Bioscience Journal*, 23, 82–88.
- FRISON, T.H. (1927) Experiments in rearing colonies of bumble-bees (Bremidae) in artificial nests. *The Biological Bulletin*, 51, 51–67.
- GARÓFALO, C.A. (1974) Aspectos evolutivos da biologia da reprodução em abelhas (Hymenoptera, Apoidea). Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado.
- HARTFELDER, K., MARKER, G.R., JUDICE, C.C., PEREIRA, G.A.G., SANTANA, W.C., DALLACQUA, R. & BITTONDI, M.M.G. (2006) Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37, 144–163.
- HEIMPEL, G.E. & DE BOER, J.G. (2008) Sex determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 53, 209–230.
- HOUAISS, A. (2001) Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Ed. Objetiva, Rio de Janeiro.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & ZUCCHI, R. (1995) Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. *Apidologie*, 26, 231–244.

- JAFFÉ, R., PIOKER-HARA, F.C., SANTOS, C.F. DOS, SANTIAGO, L.R., ALVES, D. A., DE M P KLEINERT, A., ET AL. (2014) Monogamy in large bee societies: a stingless paradox. *Die Naturwissenschaften*, 101, 261–264.
- JARAU, S., VAN VEEN, J.W., AGUILAR, I. & AYASSE, M. (2009) Virgin queen execution in the stingless bee *Melipona beecheii* : The sign stimulus for worker attacks. *Apidologie*, 40, 496–507.
- KÄRCHER, M.H., MENEZES, C., ALVES, D.A., BEVERIDGE, O.S., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & RATNIEKS, F.L.W. (2013) Factors influencing survival duration and choice of virgin queens in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Die Naturwissenschaften*, 100, 571–580.
- KERR, W. (1948) Estudos sobre o gênero *Melipona*. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 5, 181–276.
- KERR, W.E. (1950) Genetic Determination of Castes in the Genus *Melipona*. *Genetics*, 35, 143–152.
- KERR, W.E., ZUCCHI, R., NAKADAIRA, J.T. & BUTOLO, J.E. (1962) Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 70, 265–276.
- KOEDAM, D., AGUILAR MONGE, I. & SOMMEIJER, M.J. (1995) Social interactions of gynes and their longevity in queenright colonies of *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae). *Netherlands Journal of Zoology*, 45, 480–494. *Netherlands Journal of Zoology*.
- LIBERIO, S. A, PEREIRA, A.L. A, DUTRA, R.P., REIS, A.S., ARAÚJO, M.J.A., MATTAR, N.S., ET AL. (2011) Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. BioMed Central Ltd. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.
- LIN, N. & MICHENER, C.D. (1972) Evolution of sociality in insects. *The Quartely Review of Biology*.
- MACKENSEN, O. (1951) Viability and sex determination in the honey bee (*Apis mellifera* L.) *Genetics*, 36, 500–509.
- MAGALHÃES, T.L. DE & VENTURIERI, G.C. (2010) Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no Nordeste Paraense.
- MARTINS, G.F. & SERRÃO, J.E. (2004) Changes in the reproductive tract of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) queen after mating. *Sociobiology*, 44, 1–14.
- MELO, G.A.R., BUSCHINI, M.L.T. & CAMPOS, L.A.O. (2001) Ovarian activation in *Melipona quadrifasciata* queens triggered by mating plug stimulation (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 32, 355–361.

- MENEZES, C., VOLLET-NETO, A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2012) A method for harvesting unfermented pollen from stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Apicultural Research*, 51, 240–244.
- MENEZES, C., VOLLET-NETO, A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2013) An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. *Apidologie*, 44, 491–500.
- MICHENER, C. (2007) The bees of the world. In p. 953, 2nd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- MICHENER, C. (2013) The Meliponini. In *Pot-Honey: A legacy of the stingless bees* pp. 3–17. Springer Science & Business Media.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1997) Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. p. 447. Nogueirapis, São Paulo.
- VAN OYSTAEYEN, A., ALVES, D. A., OLIVEIRA, R. C., NASCIMENTO, D. L. DO, NASCIMENTO, F. S. DO, BILLEN, J. & WENSELEERS, T. (2013) Sneaky queens in *Melipona* bees selectively detect and infiltrate queenless colonies. *Animal Behaviour*, 86, 603–609.
- PEDRO, S.R.M. (2014) The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61, 348–354.
- POSEY, D.A. (1983) Folk apiculture of the Kayapo Indians of Brazil. *Biotropica*, 15, 154–158.
- PETERS, J.M., QUELLER, D.C., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., ROUBIK, D.W. & STRASSMANN, J.E. (1999) MATE NUMBER, KIN SELECTION AND SOCIAL CONFLICTS IN STINGLESS BEES AND HONEYBEES. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266, 379–384.
- RAMALHO, M. (2004) Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. *Acta Botanica Brasilica*.
- RASMUSSEN, C. (2008) Catalog of the Indo-Malayan/Australasian stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). In *Zootaxa* p. 80 pp. Magnolia Press.
- RATNIEKS, F. (2001) Heirs and spares: caste conflict and excess queen production in *Melipona* bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 50, 467–473.
- ROUBIK, D. W. (1992) Ecology and natural history of tropical bees. In p. 514, 1st edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- ROUBIK, D.W. (2006) Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37, 124–143.
- SAKAGAMI, S. F. (1982) Stingless Bees. In *Social Insects*, v. 3 pp. 361–423.
- SAKAGAMI, S.F., BEIG, D., ZUCCHI, R. & AKAHIRA, Y. (1963) Occurrence of ovary-developed workers in queen-right colonies of stingless bees. *Revista Brasileira de Biologia*, 23, 115–129.

- SANTOS-FILHO, P.S., ALVES, D. A., ETEROVIC, A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & KLEINERT, A. M.P. (2006) NUMERICAL INVESTMENT IN SEX AND CASTE BY STINGLESS BEES (APIDAE: MELIPONINI): A COMPARATIVE ANALYSIS. *Apidologie*, 37, 207–221.
- SEELEY, T.D. (1985) Honeybee ecology: a study of adaptation in social life. Princeton University Press.
- SEELEY, T.D. (2009) The Wisdom of the Hive: the social physiology of honey bee colonies. Harvard University Press.
- SERRÃO, J.E., NAVES, A.P. & ZANUNCIO, J.C. (2011) Modifications in the oviducts of workers and queens of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) with different ages. *Protoplasma*, 248, 767–773.
- SILVA, D.N. DA, ZUCCHI, R. & KERR, W. (1972) Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Animal Behaviour*, 20, 123–132.
- SILVEIRA, F.A., MELO, G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. (2002) Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Araucária, Belo Horizonte, MG.
- SOMMEIJER, M.J. & BRUIJN, L.L.M. DE (1995) Drone congregations apart from the nest in *Melipona favosa*. *Insectes Sociaux*, 42, 123–127.
- SOMMEIJER, M.J., BRUIJN, L.L.M. DE & MEEUWSEN, F.J.A.J. (2003) Reproductive behaviour of stingless bees: solitary gynes of *Melipona favosa* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) can penetrate existing nests. *Entomologische Berichten*, 63, 31–35.
- STRASSMANN, J. (2001) The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux*, 48, 1–13.
- VAN VEEN, J.W. & SOMMEIJER, M.J. (2000) Observations on gynes and drones around nuptial flights in the stingless bees *Tetragonisca angustula* and *Melipona beecheii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Apidologie*, 31, 47–54.
- VAN VEEN, J.W., SOMMEIJER, M.J. & MEEUWSEN, F. (1997) Behaviour of drones in *Melipona* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 44, 435–447.
- VAN VEEN, J.W., SOMMEIJER, M.J. & MONGE, I.A. (1999) Behavioural development and abdomen inflation of gynes and newly mated queens of *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 46, 361–365.
- VELTHUIS, H.H.W. (2002) The historical background of the domestication of the bumblebee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture. In *Pollination Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature* (eds P. Kevan & V.L. Imperatriz-Fonseca), pp. 177–184. Ministry of Environment, Brasília - DF.

- VELTHUIS, H.H.W. & VAN DOORN, A. (2006) A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37, 421–451.
- VENTURIERI, G.C., ALVES, D.A., VILLAS-BÔAS, J.K., CARVALHO, C.A.L. DE, MENEZES, C., VOLLET-NETO, A., ET AL. (2012) Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In *Polinizadores no Brasil: Contribuição e Perspectivas para a Biodiversidade, Uso Sustentável, Conservação e Serviços Ambientais* (eds V.L. Imperatriz-fonseca, D.A.L. Canhos, D. de A. Alves & A.M. Saraiva), p. 488. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- VENTURIERI, G.C., RODRIGUES, S.T. & PEREIRA, C.A.B. (2005) As abelhas e as flores do açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart. - Arecaceae). *Apacame - Mensagem Doce*.
- VIT, P., PEDRO, S.R.M. & ROUBIK, D.W. (2013) Pot-Honey: A legacy of stingless bees. In p. 654. Springer Science & Business Media, New York, NY.
- WENSELEERS, T., ALVES, D.A., FRANCOY, T.M., BILLEN, J. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2011) Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Biology Letters*, 7, 173–176.
- WENSELEERS, T., HART, A.G., RATNIEKS, F.L.W. & QUEZADA-EUÁN, J.J.G. (2004) Queen execution and caste conflict in the stingless bee *Melipona beecheii*. *Ethology*, 110, 725–736.
- WENSELEERS, T. & RATNIEKS, F.L.W. (2004) Tragedy of the commons in *Melipona* bees. *Proceedings of The Royal Society London B*, 271, S310–S312.
- WILLE, A. (1983) Biology of the stingless bees. *Annual Review of Entomology*.
- WILMS, W., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. & ENGELS, W. (1996) Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic. *STUDIES ON NEOTROPICAL Fauna and Environment*, 31, 137–151.
- WILSON, E.O. (1971) The Insect Societies. In *Harvard, Mass* p. 548. Harvard University Press, Cambridge.
- WOYKE, J. (1962) Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World*, 43, 21–25.

CAPÍTULO 1

Maturidade sexual e início do comportamento de voo em machos da abelha sem ferrão *Melipona flavolineata* Friese (Apidae, Meliponini)

Resumo

Nas sociedades das abelhas de comportamento eussocial avançado, os machos têm como única função fecundar as fêmeas reprodutivas. Para tanto, precisam adotar uma estratégia reprodutiva que aumente e favoreça suas chances de acasalar. Assumindo que essa estratégia deva ser traçada quando ainda estão na segurança do ninho, testamos o efeito da idade do indivíduo e do contexto social vivenciado, sobre a aptidão reprodutiva de machos da abelha sem ferrão *Melipona flavolineata*. Em condições de confinamento, acompanhamos 82 machos divididos em dois experimentos, um sobre a relação entre idade e aptidão reprodutiva (n = 55), no qual grupos de machos foram acompanhados durante a fase adulta até determinadas idades (categorias: 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias); e outro sobre o efeito do contexto social (n = 27), no qual os machos foram divididos em três categorias de contexto, em que variamos a quantidade de operárias, mantidos por 15 dias. O início do comportamento de voo e a maturidade sexual foram as variáveis utilizadas para mensurar a aptidão reprodutiva dos machos. Logo, ao final dos experimentos, a capacidade de voo dos machos foi testada. Em seguida, os indivíduos foram sacrificados, e seu número de espermatozoides foi estimado (métrica de maturidade sexual). A migração dos espermatozoides para as vesículas seminais se iniciou aos cinco dias de idade. A maturidade foi atingida aos 10 dias, e a habilidade de voo, aos 15 dias. O contexto social não exerceu efeito sobre a maturidade, mas afetou o voo, atrasando o início desse comportamento. Considerando que os machos dessa espécie ainda permanecem dentro do ninho por até cinco dias após se tornarem aptos para a cópula (maduros e capazes de voar), os resultados do presente trabalho sugerem que os machos aguardam dentro do ninho até atingirem o máximo de sua performance reprodutiva, o que pode favorecê-lo na sobrevivência fora do ninho e na competição por fêmeas.

Palavras-chave: idade, contexto social, número de espermatozoides, aptidão reprodutiva, acasalamento.

Abstract

In the societies of bees with advanced eusocial behavior, the males have the only function to fertilize reproductive females. Therefore, there is a need for outline a reproductive strategy to increase and promote their chances of mating. Assuming this strategy should be drawn when they are still in the safety of the hives, our study aimed to test the effect of age and the experienced social context on sexual capability of males of a stingless bee, *Melipona flavolineata*. In confined conditions, 82 males were divided in two experimental groups, one related with the effects of age on individuals sexual capability (n = 55), in which groups of males were accompanied during adulthood until certain ages (categories: 0, 5, 10 , 15, 20 and 25 days); the other one, was about the effects of social context (n = 27), in which the males were divided into three categories of contexts where amount of workers differed, maintained for 15 days. The onset of flight behavior and sexual maturity were the variables used to measure sexual capability of males. Therefore, at the end of each assay, the flight ability of males was tested. The individuals were sacrificed, and their number of spermatozoa was estimated (metric sexual maturity). The migration of sperm to seminal vesicles started at five days of age. The sexual maturity was reached at 10 days, and flight ability, at 15 days. The social context had no effect on maturity, but affected the flight, causing a delay on this behavior. Whereas males of this species remain in the nest for up to five days after becoming able for copulation (mature and capable of flying), the results of this study suggest *Melipona* males awaits in the nest until they reach their maximum reproductive performance, which may favor their survival and competition for females.

Keywords: age, social context, sperm number, sexual capability, mating.

Introdução

“Social insect males are not just simple-minded mating machines, they are shaped, constrained and perhaps trapped by sexual selection.”

(Beani et al., 2014)

Os machos das abelhas eussociais são indivíduos historicamente considerados parasitas intra-coloniais (Wilson, 1971; Beani et al., 2014) por praticamente não realizarem tarefas relacionadas à manutenção da colônia (Nogueira-Neto, 1997; Velthuis et al., 2005). Sua única função na sociedade das abelhas, entretanto, é fecundar uma fêmea receptiva, a rainha virgem em voo nupcial (Wilson, 1971; Boomsma et al., 2005). No caso dos meliponíneos (Tribo: Meliponini; Michener 2013), um grupo de abelhas eussociais, a responsabilidade do macho é ainda maior. Nesse grupo de abelhas, as rainhas acasalam apenas uma vez, com esse único, e bem-sucedido reprodutor (Kerr et al., 1962; Jaffé et al., 2014). Porém, antes que tenham a oportunidade de encontrar uma rainha para fecundar, os machos precisam passar por diversas etapas do seu ciclo de vida, dentre elas, aquelas que irão garantir a sua aptidão reprodutiva.

O ciclo desses machos começa dentro do ninho, onde emergem sexualmente imaturos e incapazes de voar (Van Veen et al., 1997). Nele permanecem, em média, durante um terço da sua vida (Camargo, 1982; Van Veen et al., 1997), se alimentando via trofaláxis com operárias, ou diretamente dos potes de alimento (Van Veen et al., 1997). São considerados indivíduos sexualmente maduros aqueles que na fase adulta apresentam vesículas seminais repletas de espermatozoides (Camargo, 1976; Cruz-Landim, 2009) e testículos degenerados (Cruz-Landim & Dallacqua, 2002; Araújo et al. 2005). Os espermatozoides migram para as vesículas seminais organizados em feixes, esses se desfazem durante o processo de maturação sexual, tornando-se livres dentro das vesículas (Moreira et al., 2004). A migração dos gametas ocorre enquanto os machos se encontram ainda no ninho (Camargo, 1984), assim como o desenvolvimento de seus músculos alares (Correa-Fernandez & Cruz-landim, 2010).

Após atingirem a maturidade, os machos de meliponíneos abandonam as colmeias permanentemente (Sakagami, 1982; Engels & Imperatriz-fonseca, 1990). No

ambiente, se aglomeram e formam agregações reprodutivas, próximas a ninhos co-específicos (Sommeijer & Bruijn, 1995; Van Veen et al., 1997; Sommeijer et al., 2004). Nelas, de dezenas a centenas de machos aguardam a chegada de rainhas virgens, e competem pela oportunidade de copular com elas (Sommeijer & Bruijn, 1995; Sommeijer et al., 2004). Ao deixarem os ninhos, os machos estão sujeitos a duas intensas pressões, a sobrevivência no ambiente (uma vez que, até o momento, se encontravam na segurança do ninho) e a competição com outros machos por parceiras sexuais. Contudo, é antes da saída, que diferentes características dos machos serão selecionadas, como o tamanho corporal, a rapidez no desenvolvimento dos espermatozoides, a sua maturação e subsequente transferência para as vesículas seminais (Pech-May et al., 2012), e possivelmente, a rapidez no desenvolvimento da musculatura associada ao voo (Cruz-Landim, 2009; Correa-Fernandez & Cruz-landim, 2010). Logo, é esperado que a etapa da vida em que os machos passam dentro da colmeia afete seu desempenho na fase final do ciclo.

Um macho apto para o acasalamento deve estar maduro o bastante para inseminar uma rainha virgem, bem como apresentar seu melhor desempenho de voo. Portanto, o momento e o contexto em que os machos atingem a sua aptidão reprodutiva podem esclarecer parte da estratégia reprodutiva que adotam, tanto no que se refere à sua sobrevivência, quanto à competição por fêmeas. Assim, na primeira parte do trabalho nos detivemos em descrever alguns detalhes do processo de amadurecimento sexual dos machos, como a quantidade de espermatozoides e a habilidade de voo em diferentes idades, para responder a seguinte pergunta: A partir de qual idade os machos se tornam sexualmente maduros e adquirem habilidades de voo? Na segunda, o objetivo foi testar se diferentes contextos sociais afetam a aptidão reprodutiva desses indivíduos.

Material e métodos

Área de estudo e espécie estudada

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA, Brasil; 1°26'11.2"S, 48°26'35.50"W), entre Março e Junho de 2014. A paisagem local é caracterizada pela presença de remanescentes florestais e por áreas de cultivos agrícolas. O clima da região é do tipo *Af* (classificação climática de Köppen-Geiger), caracterizado por altas temperaturas e precipitação mínima de 60 mm nos meses mais secos do ano (Peel et al., 2007).

A espécie estudada foi a abelha sem ferrão *M. flavolineata*, conhecida popularmente como urucu-amarela. Essa é uma espécie de distribuição restrita ao Brasil (Silveira et al., 2002), ocorrendo nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins (Pedro, 2014). As colônias desse gênero concentram a produção de machos em agrupamentos, nos favos de cria (Koedam et al., 1999) e, numa escala populacional, produzem-nos constantemente (Santos-Filho et al., 2006; Ferreira Jr. et al., 2013). Escolhemos essa espécie por duas razões: a) as agregações reprodutivas se formam próximo a ninhos co-específicos, permanecendo muitas vezes na entrada das colmeias, compostas por centenas de indivíduos (observação pessoal); e b) embora sejam temporárias, as agregações se mantêm estáveis por vários dias ou semanas nos meses de Julho a Dezembro (observação pessoal). Essas características diferem de outras espécies de *Melipona*, nas quais os machos se agregam em locais distantes dos ninhos, em grupos de poucos indivíduos. Em sua maioria, são raramente vistos, o que constitui um gargalo no estudo da biologia dessas outras espécies de *Melipona*.

Procedimentos gerais

Acondicionamento de indivíduos em laboratório

Para os experimentos, os indivíduos foram condicionados em laboratório, em dois sistemas de criação. O primeiro consistiu em minicolônias, as quais foram fundadas em caixas de madeira com dimensões de 14 cm x 14 cm x 6 cm, contendo cerume, um pote de pólen, mel (ofertado diariamente em tubo eppendorf com volume

de 5 ml) e cerca de 40 operárias de diferentes idades, porém ainda incapazes de voar. Diariamente, foram adicionadas cinco operárias recém-emergidas, para simular a constante substituição de indivíduos que ocorre dentro de uma colônia. Quando as operárias já estavam aptas a voar, eram liberadas da colônia. É importante destacar que as abelhas estiveram confinadas dentro da minicolônia, portanto sem acesso ao ambiente externo à caixa de madeira.

O segundo sistema consistiu no acondicionamento dos indivíduos em placas de Petri. No presente estudo, foram utilizadas placas de Petri com diâmetro de 9 cm, e altura de 1,2 cm. O pólen e o mel foram ofertados em microtubos eppendorf de 1 ml, e foram trocados diariamente. Tanto as placas de Petri, como as caixas de minicolônias foram mantidas em estufa B.O.D. (28 °C).

A manutenção dos sistemas de confinamento das abelhas foi realizada diariamente, consistindo na reposição dos alimentos ofertados, retirada de resíduos (lixo e fezes), e registro de possíveis mortes dos indivíduos. Antes dos procedimentos de manutenção, o comportamento dos indivíduos era observado por algum tempo, com o objetivo de caracterizar/diferenciar qualitativamente os diferentes sistemas de confinamento.

Estimativa do número de espermatozoides

Os machos possuem um par de vesículas seminais, alojadas dentro do abdome. Através de uma leve pressão nessa região, as vesículas seminais foram extraídas dos indivíduos ainda íntegras, e adicionadas a 50 µl de solução fisiológica (S1). Após 15 minutos, a mistura foi homogeneizada e adicionou-se 5 µl de S1 a 45 µl de solução fisiológica (S2), obtendo-se uma diluição de 1:10. Por fim, 10 µl de S2 foram colocados em uma câmara de contagem de células (câmara de Neubauer), para se realizar a estimativa do número de espermatozoides presentes no par de vesículas. Dessa câmara, 64 quadrantes externos foram contabilizados, sendo realizada uma contagem para cada amostra. O protocolo para essa estimativa foi adaptado de Schlüns et al. (2003).

Desenho experimental

Quando os machos se tornam sexualmente maduros?

Machos com idade conhecida foram mantidos em laboratório, desde a emergência do adulto, para a estimativa do número de espermatozoides em diferentes categorias de idade. A partir de 10 discos de cria nascentes, provenientes de colônias diferentes, foram obtidos machos recém-emergidos. Todos os indivíduos emergidos durante um período de 24h foram acondicionados numa placa de Petri grande, contendo alimento *ad libitum* (mel de *Apis mellifera* e pólen de *M. flavolineata*) e algumas operárias, em estufa B.O.D. (28°C).

Em seguida, os machos foram colocados em minicolônias (n = 12), e separados em grupos de oito. Foram mantidos nesse sistema desde um dia de vida até a idade correspondente à categoria de idade de cada grupo (0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias). Ao atingirem a idade de suas respectivas categorias, os indivíduos foram sacrificados, para se proceder à contagem, e subsequente estimativa do número de espermatozoides armazenados nas vesículas seminais. Os indivíduos pertencentes à categoria zero dia não foram inseridos em minicolônias, uma vez que foram sacrificados logo após a sua emergência.

Em quais condições os machos se tornam sexualmente maduros?

O sistema anteriormente citado foi utilizado para se ter conhecimento da idade dos machos. Nesse experimento, os indivíduos foram acondicionados em quatro contextos sociais: macho em placa de Petri sem operárias (C1, n = 15); macho em placa de Petri acompanhado de outros machos (C2, n = 15); macho em placa de Petri acompanhado de operárias (C3, n = 15); e machos em minicolônia acompanhados de operárias (C4, n = 19) (Tabela 1). Esses foram mantidos em confinamento durante 15 dias, a partir da sua emergência. Ao atingirem essa idade, foi mensurada a maturidade sexual de cada indivíduo através da estimativa do número de espermatozoides presentes nas vesículas seminais.

Tabela 1 - Descrição dos diferentes tratamentos de contextos sociais em que foram mantidos confinados, durante 15 dias, os machos de *Melipona flavolineata*.

Contextos sociais	Descrição do contexto	Significado
Placa sem operárias I (C1)	Um macho sozinho	Ausência de interações
Placa sem operárias II (C2)	Grupo de cinco machos	Interações apenas com machos
Placa com operárias (C3)	Um macho acompanhado de três operárias nutrízes	Interações apenas com operárias
Minicolônia (C4)	Grupo de 08 machos em contexto de minicolônia	Interações com operárias (de diferentes idades) e machos

Quando os machos se tornam aptos para o voo?

Antes da extração das vesículas seminais de cada macho, foi realizado um teste de voo. O indivíduo foi colocado na margem de uma superfície plana (cerca de 1m de altura em relação ao chão), de frente para uma janela iluminada, a 1,5 m de distância. O macho era estimulado ao voo a partir de uma leve compressão, recebida sobre o dorso do tórax. Nos próximos segundos, verificamos se o macho voava em direção à janela, ou se caía no chão. Caso desempenhasse com sucesso o voo até a janela, era considerado “voo perfeito”. Caso caísse no chão, andasse ou realizasse voos rasantes, como se estivessem pulando, era considerado “iniciando voo”. Se o indivíduo apenas andasse, era considerado “não iniciou voo”.

Esse procedimento foi realizado com machos pertencentes aos experimentos anteriormente descritos. Portanto, os resultados dos testes de voo serão apresentados em correspondência aos respectivos experimentos.

Análise dos dados

Para testar em que idade os machos de *M. flavolineata* se tornaram sexualmente maduros, utilizamos o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, e o a posteriori de comparação múltipla de ranks, uma vez que as amostras não atenderam aos pressupostos dos teste paramétricos (Siegel & Castellan Jr., 2006).

Para testar sob quais condições os machos se tornaram sexualmente maduros, foi utilizado o teste paramétrico ANOVA 1-fator, uma vez que as amostras atenderam aos pressupostos de homogeneidade de variâncias e de resíduos. Por fim, para testar se existe diferença no comportamento de voo em machos de diferentes idades, e em diferentes contextos sociais, utilizamos o teste Qui-quadrado (Siegel & Castellan Jr., 2006).

Resultados

Descrição do comportamento dos machos em condições de laboratório

Em condições de confinamento, os machos recém-emergidos passaram a maior parte do tempo entre as lâminas de cerume e abaixo dele. No início, foram observadas numerosas interações com operárias, em especial, para solicitar alimento via trofaláxis. Progressivamente, os machos já eram vistos com frequência, próximos aos potes de pólen e ao eppendorf contendo mel, alimentando-se de forma independente.

O comportamento dos indivíduos acondicionados em placas de Petri foi bastante simplificado, em correspondência à simplicidade do contexto das placas. Também observamos a progressiva independência dos machos recém-emergidos, em relação à interação com as operárias. Contudo, não foi possível a esses indivíduos “escolherem” um local de sua “preferência”, uma vez que não havia lâminas de cerume ou potes de alimento, num espaço tão reduzido.

Número de espermatozoides e comportamento de voo em diferentes idades

Observamos que a migração de espermatozoides para as vesículas seminais tem início no intervalo entre o primeiro e quinto dia após a emergência do adulto, de modo que foi possível constatar a presença de feixes de espermatozoides (Figura 1) em

machos com cinco dias ($n = 10$). Aos 10 dias de idade, já não encontramos os feixes na maioria dos indivíduos, e observamos a presença de espermatozoides individualizados (Tabela 2).



Figura 1 – Feixe de espermatozoides nas vesículas seminais de machos de *Melipona flavolineata* (aproximadamente 50 células aglomeradas). Aumento: 400x. Foto: Jamille Veiga.

Tabela 2 – Número estimado de espermatozoides de 55 machos de *Melipona flavolineata* pertencentes a diferentes categorias de idade, acondicionados em minicolônias confinadas.

Categorias de idade (dias)	Número de indivíduos (n)	Número médio de espermatozoides estimados ± D. P.	Número mínimo e máximo de espermatozoides estimados	Descrição
Recém-emergidos (0)	06	0	0	Ausência de espermatozoides (n = 06).
05	10	96.450 ± 122.332	2.750 - 313.750	Presença de espermatozoides livres (n = 10) e de feixes de espermatozoides (n = 10).
10	10	303.875 ± 122.988	97.500 - 521.250	Presença de espermatozoides livres (n = 10) e feixes de espermatozoides (n = 02).
15	09	499.444 ± 122.144	327.500 - 637.500	Presença de espermatozoides livres (n = 09).
20	10	494.500 ± 163.387	220.000 - 700.000	Presença de espermatozoides livres (n = 10).
25	10	429.500 ± 171.316	97.500 - 666.250	Presença de espermatozoides livres (n = 10).

Encontramos diferenças no número de espermatozoides em machos pertencentes a diferentes idades (KW-H_(5;55) = 36,425; p < 0,001). Dentre elas, as categorias de zero e cinco dias de idade não diferiram entre si, mas se diferenciaram das demais idades. Por outro lado, não houve diferença entre machos pertencentes às idades de 10, 15, 20 e 25 dias (Figura 2).

Em relação ao comportamento de voo, houve diferença entre indivíduos pertencentes a diferentes idades ($\chi^2 = 110$; GL = 10; p < 0,001). Entre zero e cinco dias, nenhum indivíduo realizou voo (n = 16; 29,09%). O comportamento se iniciou aos 10 dias (n = 10; 18,8%), quando os machos desempenhavam apenas voos rasantes (para visualizar o comportamento, acesse o link: <http://migre.me/oPhbo>). Aos 15 dias, já eram capazes de realizar voos perfeitos, mantendo tal capacidade até os 25 dias (n = 29; 52,73%).

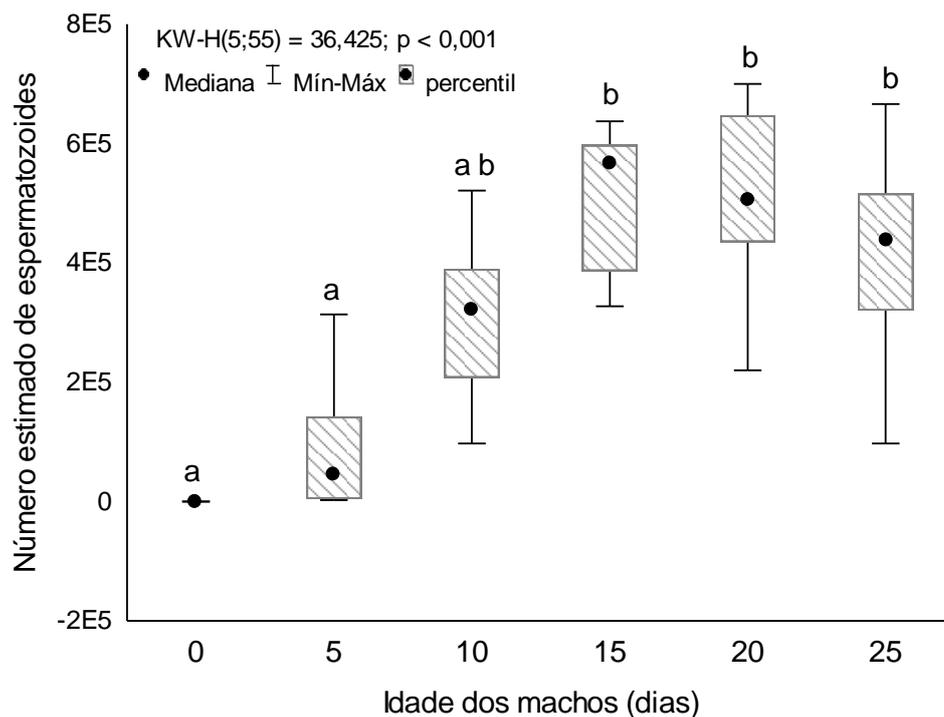


Figura 2 – Número estimado de espermatozoides nas vesículas seminais de machos de *Melipona flavolineata* pertencentes a diferentes idades. O ponto central indica a mediana, o boxplot representa 25% - 75% do conjunto de dados, e a barra vertical informa os valores mínimo e máximo de cada categoria. As letras indicam diferenças significativas entre as categorias ao nível de 5%.

Número de espermatozoides e comportamento de voo em diferentes contextos

A porcentagem de machos mortos nos tratamentos sem operárias foi alta, restando somente dois indivíduos da condição de criação C1 (86,66% morreram) e cinco indivíduos da condição C2 (66,66% morreram). Dessa forma, os indivíduos sobreviventes nesses tratamentos foram analisados em conjunto, numa nova categoria *C1: Machos em placas de Petri sem operárias* (Tabela 3). A partir da estimativa da maturidade sexual de 26 machos, observamos uma variação de $58,75 \times 10^3$ - $90,5 \times 10^4$ células, não havendo diferença no número de espermatozoides entre as três categorias de contexto social (Anova 1-Fator: $F_{(2,23)} = 0,477$; $p = 0,627$) (Tabela 3). Observamos a presença de feixes de espermatozoides em apenas um macho, pertencente ao contexto *C2: Machos com operárias em placa de Petri*.

Nesse experimento, restringimos a análise dos testes de voo à comparação entre C2 (placa de Petri com algumas operárias) e C3 (minicolônia com várias operárias), devido ao controle de uma terceira variável, a presença/ausência de operárias. Observamos diferenças no comportamento de voo de machos criados nos diferentes contextos ($\chi^2 = 12,436$; GL = 1; $p = 0,0004$). Lembrando que todos os machos desse experimento completavam 15 dias de idade, idade na qual todos já deveriam estar aptos para o voo, observamos que a proporção de machos que realizavam voos perfeitos em C2 ($n = 2$; 10,53%) foi menor que em C3 ($n = 9$; 47,37%).

Tabela 3 – Variação da estimativa do número de espermatozoides presentes nas vesículas seminais de machos de *Melipona flavolineata*. Os indivíduos foram mantidos em diferentes contextos sociais, em confinamento, durante 15 dias.

Contexto social	Número de indivíduos (n)	Número médio de espermatozoides estimados \pm D. P.	Número mínimo e máximo
Machos em placa de Petri sem operárias (C1)*	07	503.214 \pm 286.429	58.750 - 905.000
Macho em placa de Petri com operárias (C2)	10	583.375 \pm 209.486	230.000 - 826.250
Machos em minicolônia (C3)	09	499.444 \pm 122.144	327.500 - 637.500

*Esse contexto compreende os tratamentos C1 e C2, definidos no item *Material e métodos* como C1: Macho sozinho (sem operárias), e C2: Machos acompanhados de outros machos (em grupo). Separadamente, a estimativa do número de espermatozoides (média \pm D. P.) para cada categoria, C1 (n = 2) e C2 (n = 5), foi de 551.250 (\pm 126.250) e 484.000 (\pm 301.302) células, respectivamente.

Discussão

Relação entre idade dos machos e a aptidão reprodutiva

Demonstramos que os espermatozoides dos machos de *M. flavolineata* iniciam sua migração para as vesículas seminais no intervalo entre um e cinco dias de vida, após a emergência do adulto, podendo se estender até os 10 dias em alguns indivíduos. Como nos demais Aculeata (Apidae e Formicidae, ver Moreira et al. 2004), os espermatozoides dos machos de *M. flavolineata* migram dos testículos sob a forma de feixes para as vesículas seminais (Cruz-Landim & Dallacqua, 2002), onde esses feixes se desfazem (Moreira et al., 2004; Cruz-Landim, 2009). Tais feixes foram observados em machos com cinco dias de idade, entretanto já haviam se desfeito na maioria dos machos com 10 dias.

Existe uma idade em que a migração de espermatozoides se estabiliza (Camargo, 1984; Lima et al., 2006; Brito et al., 2010). Neste estudo, demonstramos que em machos de *M. flavolineata*, a migração se estabiliza aos 10 dias, evento este associado à degeneração dos testículos, como já observado em outras espécies de meliponíneos (em *Scaptotrigona xanthotricha* por Araújo et al., 2005; em *Friesella schrottkyi* por Brito et al., 2010; em *M. mondury* por Lima et al., 2006). Embora não tenhamos verificado a degeneração testicular, a estabilidade no número de espermatozoides a partir dos 10 dias de idade, e que se estende até os 25 dias, indica que após o 10º dia da emergência do adulto, a migração de gametas cessa. Logo, é provável que a degeneração dos testículos também se inicie a partir desse momento.

Observamos, portanto, que existem dois momentos associados à maturidade sexual dos machos de *M. flavolineata*: antes da estabilização da migração de espermatozoides (0 a 10 dias de idade), e depois da migração se completar (15 a 25 dias), quando os machos atingem o número máximo de espermatozoides nas vesículas seminais. Além da maturidade sexual, constatamos que o início do comportamento de voo também teve relação com a idade, uma vez que esse comportamento se iniciou em indivíduos com 10 dias de idade, atingindo seu ápice aos 15 dias.

Van Veen et al. (1997), ao estudarem o comportamento de machos de *M. beecheii* e *M. favosa*, observaram que estes já eram capazes de voar perfeitamente

aos 11 dias, e que deixavam o ninho somente aos $18,6 \pm 2,8$ dias (média \pm D.P.). Há muito tempo se assume que os machos deixam os ninhos logo após atingirem a maturidade sexual. Entretanto, fica claro que existe um descompasso entre a idade em que os machos atingem tais requisitos e a idade em que deixam definitivamente o ninho (Cortopassi-Laurino, 1979; Van Veen et al. 1997; ver Resultados). A constatação de um intervalo entre o início do comportamento de voo e o momento em que os machos de meliponíneos partem para a formação de agregações reprodutivas despertou o seguinte questionamento: por que os machos continuam dentro do ninho, por algum tempo, mesmo já sendo sexualmente maduros e capazes de voar? (Van Veen et al., 1997).

Até o momento, as etapas do ciclo de vida dos machos de abelhas sem ferrão, e sua relação com a idade, haviam sido investigadas de forma fragmentada, e o ciclo descrito a partir de informações de diferentes espécies. No presente estudo, apresentamos dados de uma mesma espécie, pela primeira vez, referentes a duas etapas decisivas no ciclo de vida de um macho. O desenvolvimento da maturidade sexual e a aquisição da capacidade de voo, aqui explorados, são complementados por um estudo recente, realizado por Silva (2014). A autora acompanhou 96 machos, a partir da sua emergência, em quatro colônias de *M. flavolineata*, registrando comportamentos intra- e extranidais desses indivíduos. Com o presente trabalho e o de Silva (2014), temos dados que podem ser analisados em conjunto.

Os machos emergem sem a capacidade de voar (Correa-fernandez & Cruz-landim, 2010) e de se reproduzir (Camargo, 1984), permanecendo dentro do ninho no início de sua vida adulta (Cortopassi-Laurino, 1979; Van Veen et al., 1997). Nessa fase, eles têm acesso à alimentação, interagem constantemente com operárias de diferentes idades (Veen et al., 1997; Silva, 2014), e com outros machos (Silva, 2014). É nesse contexto, portanto, que se inicia e se completa o desenvolvimento de sua musculatura alar (Veen et al. 1997; Cruz-Landim 2009; ver Resultados - *Início do comportamento de voo*), e a migração de espermatozoides para as vesículas seminais (ver Resultados – *Maturidade sexual em diferentes idades*). Os machos de *M. flavolineata*, por volta dos 14 dias de vida, iniciam um deslocamento em grupo, em direção à entrada no ninho (Silva, 2014; comportamento também observado em *T. angustula* por Santos, 2012). Demonstramos que aos 10 dias, os indivíduos já iniciaram

o comportamento de voo, e muitos já se encontram sexualmente maduros, portanto, aos 14 dias de idade, poderiam ser considerados completamente aptos a deixar o ninho. Entretanto, os grupos de machos permanecem próximos à entrada do ninho durante alguns dias, até que decidem voluntariamente abandonar a colmeia aos 20,5 dias (Silva, 2014), partindo para a formação de agregações reprodutivas.

Dessa forma, o inesperado comportamento dos machos de permanecerem dentro dos ninhos, mesmo estando aptos para o voo (Van Veen et al., 1997) e para o acasalamento, pode ser interpretado como um “intervalo de confiança”, no qual os indivíduos não apenas atingem o ápice de suas capacidades, mas também alcançam outros requisitos necessários para viverem fora dos ninhos. Um bom exemplo seria a completa esclerotização da cutícula, como ocorre nas operárias antes de iniciarem as atividades de forrageio (Elias-Neto et al., 2009; 2014), ou mesmo das placas que compõem a cápsula genital (nos machos; Michener, 1990; 2007). Portanto, pode ser desvantajoso para um macho deixar a colônia prematuramente, uma vez que atingir a maturidade e realizar voos não indicam necessariamente que os indivíduos alcançaram o máximo de suas capacidades ou todos os requisitos necessários para uma vida independente da colônia. Por sua vez, estar no ápice de seu desempenho é preciso, pois no ambiente externo, suas chances de morrer por predação (Kärcher et al., 2008; Koedam et al., 2009; 2011) e parasitismo são altas (Brown, 1997), e a competição por fêmeas é acirrada (Alcock, 1978; Van Veen & Sommeijer, 2000). Respeitar esse possível “intervalo de confiança”, para assim desenvolver ao máximo sua aptidão reprodutiva, pode favorecê-los na sobrevivência fora dos ninhos e na competição por rainhas virgens, o que pode ser considerado parte de sua estratégia reprodutiva.

Para as colônias, manter um macho maduro dentro da colônia (ou vários, como pudemos constatar), pode representar um risco de endocruzamento. Em meliponíneos, o acasalamento entre irmãos tem como consequência a produção de machos diploides (Camargo, 1979; Carvalho, 2001; Alves et al., 2011). Numa colônia, a presença desses machos não é desejada, uma vez que estes não contribuem com a força de trabalho (por serem machos), tão pouco com a reprodução (por terem longevidade reduzida e sua prole não ser viável; Camargo, 1982; Cook & Crozier, 1995). A presença desses machos resulta em elevadas taxas de substituição de rainhas

(Alves et al., 2011). Num ciclo vicioso, a colônia produz cada vez mais machos diploides, conseqüentemente reduz sua população de fêmeas (em especial de operárias), reduz os estoques de alimento e, aos poucos, definha (Zayed & Packer, 2005; Hedrick et al., 2006).

As chances de um acasalamento ocorrer dentro do ninho são reais, como ocorre em outros grupos de abelhas. Em pelo menos seis espécies de abelhas do gênero *Bombus* (Apidae: Bombini), os machos têm o comportamento de aguardar por fêmeas, que estão prestes a emergir, próximos a entrada de seus ninhos (Krüger, 1951; Foster, 1992; Darvill et al., 2007), permitindo que a cópula aconteça no interior dos ninhos, antes que essas fêmeas saiam para o ambiente. Se considerarmos que as rainhas fisogástricas dos Meliponini, mesmo após o acasalamento, continuam a atrair machos (Sakagami & Laroca, 1953; Campos & Melo, 1990; observação pessoal em *M. flavolineata*), é possível que estes sejam estimulados a copulá-las dentro da colmeia. Ou ainda, num contexto de orfandade, existe a possibilidade dos machos tentarem copular com suas irmãs rainhas virgens, quando estas estão sexualmente atrativas, uma vez que é processo que se dá dentro do ninho. Em ambas as situações, manter esses indivíduos pode comprometer a sobrevivência da colônia.

Por outro lado, manter os machos dentro do ninho também pode ser vantajoso para as colônias. Por mais que os zangões não realizem tarefas ligadas à manutenção do ninho, sendo muitas vezes considerados como parasitas intra-coloniais (Wilson, 1971; Beani et al., 2014), entendemos que os machos são aquilo que de mais valioso existe para o superorganismo colônia (Seeley, 1985; Tautz, 2008), os seus gametas de alta mobilidade. Portanto, representam para a colônia a sua capacidade de dispersar genes (Seeley, 1985). Assim, ao assegurarem a viabilidade dos zangões até o momento de sua liberação no ambiente, as colônias favorecem as chances de manterem seus próprios alelos representados na população.

Contexto social e a aptidão reprodutiva

A migração dos espermatozoides ocorreu em diferentes contextos sociais, com os machos alcançando o número máximo de células nas vesículas seminais na idade esperada e, portanto, sem atrasos na maturação sexual. A ausência de efeito do contexto social sobre a maturidade indica que a complexidade da interação social não é um fator determinante na migração dos espermatozoides. Se o contexto social afeta outros aspectos da aptidão reprodutiva dos machos adultos, a exemplo da qualidade dos espermatozoides, como observado em *Apis mellifera* (Gençer & Kahya, 2011; Abdelkader et al., 2014), ou alterações em glândulas associadas ao comportamento de cópula, como em *Bombus lucorum* (Žáček et al., 2009), são efeitos que ainda precisam ser investigados nos meliponíneos.

Embora não tenha afetado a migração de espermatozoides, o contexto social influenciou o início do comportamento de voo dos indivíduos. A complexidade das interações sociais afetou o comportamento de voo dos machos, resultando em um atraso no início desse comportamento na idade esperada. Sabemos que os adultos de abelhas eussociais têm diferentes requerimentos de voo, que estão fortemente associados à sua função dentro da colônia (Cruz-Landim, 2009). As operárias desenvolvem os músculos de voo de acordo com a tarefa que realizam, a qual depende da idade (Correa-Fernandez & Cruz-landim, 2010). Nas rainhas virgens e nos machos, a necessidade é voltada para o acasalamento. Provavelmente, um contexto tão simplificado como a placa de Petri, onde havia poucas operárias, não forneceu os estímulos necessários ao início desse comportamento.

Outro efeito observado, porém não testado, foi o grande número de indivíduos mortos nos tratamentos de criação de machos sem operárias. Isso indica que a interação com operárias pode ser um fator limitante para a sua sobrevivência. Sugerimos que novos experimentos sejam feitos para melhorar a precisão dessa informação.

Referências

- ABDELKADER, F.B., KAIRO, G., TCHAMITCHIAN, S., COUSIN, M., SENECHAL, J., CRAUSER, D., ET AL. (2014) Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie*, 45, 215–223.
- ALCOCK, J. (1978) The ecology and evolution of male reproductive behaviour in the bees and wasps. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 64, 293–326.
- ALVES, D.A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., FRANCOY, T.M., SANTOS-FILHO, P.S., BILLEN, J. & WENSELEERS, T. (2011) Successful maintenance of a stingless bee population despite a severe genetic bottleneck. *Conservation Genetics*, 12, 647–658.
- ARAÚJO, V.A., ZAMA, U., DOLDER, H. & LINO-NETO, J. (2005) Morphology and ultrastructure of the spermatozoa of *Scaptotrigona xanthotricha* Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal of Morphological Science*, 22, 137–141.
- ARAÚJO, V.A., ZAMA, U., NEVES, C.A., DOLDER, H. & LINO-NETO, J. (2005) Ultrastructural, histological and histochemical characteristics of the epithelial wall of the seminal vesicle of mature *Scaptotrigona xanthotricha* Moure males (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Brazilian Journal of Morphological Science*, 22, 193–201.
- BEANI, L., DESSÌ-FULGHERI, F., CAPPA, F. & TOTH, A. (2014) The trap of sex in social insects: from the female to the male perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.
- BOOMSMA, J.J., BAER, B. & HEINZE, J. (2005) The evolution of male traits in social insects. *Annual Review of Entomology*, 50, 395–420.
- BRITO, P., ZAMA, U., DOLDER, H. & LINO-NETO, J. (2010) New characteristics of the male reproductive system in the Meliponini bee, *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae): histological and physiological development during sexual maturation. *Apidologie*, 41, 203–215.
- BROWN, B. V. (1997) Parasitic phorid flies: a previously unrecognized cost to aggregation behavior of male stingless bees. *Biotropica*, 29, 370–372.
- CAMARGO, C.A. (1976) Determinação do sexo e controle da reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Universidade de São Paulo.
- CAMARGO, C.A. (1979) Sex determination in bees. XI Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata*. *Journal of Apicultural Research*, 18, 77–84.
- CAMARGO, C.A. (1982) Longevity of Diploid Males, Haploid Males, and Workers of the Social Bee *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 55, 3–12.

- CAMARGO, C.A. (1984) Spermatozoa numbers and migration to the seminal vesicle in haploid and diploid males of *Melipona quadrifasciata* Lepeletier. *Journal of Apicultural Research*, 23, 15–17.
- CAMPOS, L.A.O. & MELO, G.A.R. (1990) Physogastric-queen mating in *Melipona quadrifasciata* Lep.(Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Genetica*, 13, 491–500.
- Carvalho, G.A. (2001) The number of sex alleles (CSD) in a bee population and its practical importance (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 10, 10-15.
- COOK, J.M. & CROZIER, R.H. (1995) Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 281–286.
- CORREA-FERNANDEZ, F. & CRUZ-LANDIM, C. (2010) Differential flight muscle development in workers, queens and males of the eusocial bees, *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica*. *Journal of Insect Science*, 10, 10–85.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. (1979) Observações sobre atividades de machos de *Plebeia droryana* Friese (Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Entomologia*.
- CRUZ-LANDIM, C. (2009) Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas. In p. 408. Editora UNESP, São Paulo.
- CRUZ-LANDIM, C. & DALLACQUA, R.P. (2002) Testicular reabsorption in adult males of *Melipona bicolor bicolor* Lepeletier (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Cytologia*, 67, 145–151.
- DARVILL, B., LYE, G. & GOULSON, D. (2007) Aggregations of male *Bombus muscorum* (Hymenoptera: Apidae) at mature nests. Incestuous brothers or amorous suitors? *Apidologie*.
- ELIAS-NETO, M., NASCIMENTO, A.L.O., BONETTI, A.M., NASCIMENTO, F.S., MATEUS, S., GARÓFALO, C.A. & BITONDI, M.M.G. (2014) Heterochrony of cuticular differentiation in eusocial corbiculate bees. *Apidologie*, 45, 397–408.
- ELIAS-NETO, M., SOARES, M.P.M. & BITONDI, M.M.G. (2009) Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie*, 40, 29–39.
- ENGELS, W. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (1990) Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In *Social Insects* pp. 167–230. Springer Berlin Heidelberg.
- FERREIRA, N.T., BLOCHTEIN, B. & SERRÃO, J.E. (2013) Seasonal production and spatial distribution of *Melipona bicolor schencki* (Apidae; Meliponini) castes in brood combs in southern Brazil. *Apidologie*, 44, 176–187.

- FOSTER, R.L. (1992) Nestmate recognition as an inbreeding avoidance mechanism in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 238–243.
- GENÇER, H. V. & KAHYA, Y. (2011) Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *Journal of Apicultural Research*, 50, 130–137.
- HEDRICK, P.W., GADAU, J. & PAGE, R.E. (2006) Genetic sex determination and extinction. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 55–57.
- JAFFÉ, R., PIOKER-HARA, F.C., DOS SANTOS, C.F., SANTIAGO, L.R., ALVES, D. A, DE M P KLEINERT, A., ET AL. (2014) Monogamy in large bee societies: a stingless paradox. *Die Naturwissenschaften*, 101, 261–264.
- KÄRCHER, M.H., BIEDERMANN, P.H.W., HRASSNIGG, N. & CRAILSHEIM, K. (2008) Predator-prey interaction between drones of *Apis mellifera carnica* and insectivorous birds. *Apidologie*, 39, 302–209.
- KERR, W.E., ZUCCHI, R., NAKADAIRA, J.T. & BUTOLO, J.E. (1962) Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 70, 265–276.
- KOEDAM, D., CONTRERA, F.A.L. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (1999) Clustered male production by workers in the stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 46, 387–391.
- KOEDAM, D., MORGAN, E.D., NUNES, T.M., PATRICIO, E.F., PATRICIO, L.R.A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2011) Selective preying of the sphecid wasp *Trachypus boharti* on the Meliponine bee *Scaptotrigona postica*: Potential involvement of caste-specific cuticular hydrocarbons. *Physiological Entomology*, 36, 187–193.
- KOEDAM, D., SLAA, E.J., BIESMEIJER, J.C. & NOGUEIRA-NETO, P. (2009) Unsuccessful attacks dominate a drone-preying wasp's hunting performance near stingless bee nests. *Genetics and Molecular Research*, 8, 690–702.
- KRÜGER, E. (1951) Über die Balinflüge der Männchen der Gattungen *Bombus* und *Psithyrus* (Bombidae Hymenopt.). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 8, 61–75.
- LIMA, M., LINO-NETO, J. & CAMPOS, L. (2006) Sexual maturation in *Melipona mondury* males (Apidae: Meliponini). *Brazilian Journal of Morphological Science*, 23, 369–375.
- MICHENER, C. (2007) The bees of the world. In p. 953, 2nd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- MICHENER, C. (2013) The Meliponini. In *Pot-Honey: A legacy of the stingless bees* pp. 3–17. Springer Science & Business Media, New York.

- MICHENER, C.D. (1990) Classification of the Apidae (Hymenoptera). *University of Kansas Science Bulletin*, 54, 75–164.
- MOREIRA, J., ZAMA, U. & LINO-NETO, J. (2004) Release, behavior and phylogenetic significance of spermatozoa in bundles in the seminal vesicle during sexual maturation in aculeata (Hymenoptera). *Brazilian Journal of Morphological Science*, 21, 185–189.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1997) Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. In p. 447. Nogueirapis, São Paulo.
- PECH-MAY, F.G., MEDINA-MEDINA, L., MAY-ITZÁ, W.J., PAXTON, R.J. & QUEZADA-EUÁN, J.J.G. (2012) Colony pollen reserves affect body size, sperm production and sexual development in males of the stingless bee *Melipona beecheii*. *Insectes Sociaux*, 59, 417–424.
- PEDRO, S.R.M. (2014) The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 61, 348–354.
- PEEL, M.C., FINLAYSON, B.L. & MCMAHON, T.A. (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, 11, 1633–1644.
- SAKAGAMI, S. (1982) Stingless Bees. *Social Insects*, v. 3 pp. 361–423.
- SAKAGAMI, S.F. & LAROCA, S. (1953) Additional observations on the habits of the cleptobiotic stingless bees, the genus *Lestrimelitta* Friese (Hymenoptera, Apoidea). *Jour. Fac. Sci. Hollaido Univ. Ser.*, 1.
- SANTOS, C.F. (2012) Biologia reprodutiva das rainhas e machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini). Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado.
- SANTOS-FILHO, P.S., ALVES, D. A., ETEROVIC, A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & KLEINERT, A. M.P. (2006) Numerical investment in sex and caste by stingless bees (Apidae: Meliponini): a comparative analysis. *Apidologie*, 37, 207–221.
- SCHLÜNS, H., SCHLÜNS, E.A., PRAAGH, J. VAN & MORITZ, R.F.A. (2003) Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*, 34, 577–584.
- SEELEY, T.D. (1985) Honeybee ecology: a study of adaptation in social life. Princeton University Press.
- SIEGEL, S. & CASTELLAN JR., N.J. (2006) Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. p. 4482^a ed. Artmed, Porto Alegre.
- SILVA, R. DE A. (2014) Zangões de *Melipona flavolineata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): comportamento intranidal e agregados reprodutivos. Instituto de

Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA. Trabalho de Conclusão de Curso.

SILVEIRA, F.A., MELO, G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. (2002) Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. p. 253, 1ª edition. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Araucária, Belo Horizonte, MG.

SOMMEIJER, M., BRUIJN, L. DE & MEEUWSEN, F. (2004) Behaviour of males, gynes and workers at drone congregation sites of the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae: Meliponini). *Entomologische Berichten*, 64, 10–15.

SOMMEIJER, M.J. & BRUIJN, L.L.M. DE (1995) Drone congregations apart from the nest in *Melipona favosa*. *Insectes Sociaux*, 42, 123–127.

TAUTZ, J. (2008) The Buzz about Bees - Biology of a superorganism. p. 284.

VAN VEEN, J.W. & SOMMEIJER, M.J. (2000) Observations on gynes and drones around nuptial flights in the stingless bees *Tetragonisca angustula* and *Melipona beecheii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Apidologie*, 31, 47–54.

VAN VEEN, J.W., SOMMEIJER, M.J. & MEEUWSEN, F. (1997) Behaviour of drones in *Melipona* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 44, 435–447.

VELTHUIS, H.H.W., KOEDAM, D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2005) The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. *Apidologie*, 36, 169–185.

WILSON, E.O. (1971) The Insect Societies. In *Harvard, Mass* p. 548. Harvard University Press, Cambridge.

ŽÁČEK, P., KALINOVÁ, B., ŠOBOTNÍK, J., HOVORKA, O., PTÁČEK, V., COPPÉE, A., ET AL. (2009) Comparison of age-dependent quantitative changes in the male labial gland secretion of *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum*. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 698–705.

ZAYED, A. & PACKER, L. (2005) Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10742–10746.

CAPÍTULO 2

Atratividade sexual de rainhas virgens de *Melipona flavolineata* Friese (Apidae, Meliponini) em diferentes idades e a importância do contexto social

Resumo

Ao investigar o efeito da idade, e das interações sociais que as fêmeas reprodutivas de abelhas eussociais vivenciam, sobre a sua aptidão reprodutiva, podemos obter evidências sobre as estratégias reprodutivas que adotam. Em abelhas sem ferrão, uma tribo de abelhas eussociais, as estratégias reprodutivas parecem variar tanto quanto seu número de espécies. Nosso objetivo foi descrever o desenvolvimento da atratividade sexual de rainhas virgens de *Melipona flavolineata* ao longo da fase adulta, e testá-la em diferentes contextos sociais. Para tanto, um total de 124 rainhas virgens foi distribuído em dois grupos de experimentos. No primeiro, 64 rainhas foram acondicionadas em minicolônias, onde foram mantidas até atingirem determinadas idades (categorias: 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18). No segundo, as rainhas foram submetidas a seis diferentes contextos sociais, havendo variação no número de operárias e de rainhas virgens presentes, onde foram mantidas por seis dias. Ao completarem as idades estipuladas, a atratividade sexual das rainhas foi testada por meio da sua apresentação individual a 10 zangões sexualmente maduros, em arena de cópula. As rainhas virgens se tornam sexualmente atrativas a partir dos três dias de idade, mantendo-se atrativas até 18 dias. Rainhas isoladas do contexto social não se tornaram atrativas, diferindo bastante de rainhas que vivenciaram contextos sociais complexos, como as minicolônias. Demonstramos que a atratividade (tentativas dos machos) e a receptividade (acasalamentos efetivos) sexual se desenvolvem na fase adulta. O nível de atratividade se mantém nessa fase, e pode se modificar em consequência do contexto social vivenciado. Com a investigação da aptidão reprodutiva, em diferentes momentos da vida das rainhas, conseguimos obter evidências comportamentais sobre uma possível estratégia reprodutiva em *Melipona*. Essa estratégia consiste em que as rainhas estejam *sempre prontas* para acasalar, ou seja, mantendo constante a sua atratividade e a receptividade sexual o máximo de tempo possível. Além disso, demonstramos a importância das interações sociais sobre

o desenvolvimento da aptidão reprodutiva de rainhas virgens, que devem ser adequadas para que elas desenvolvam suas capacidades reprodutivas.

Palavras-chave: aptidão reprodutiva, isolamento social, interação, minicolônia, estratégia reprodutiva.

Abstract

Investigating the effect of age and social interactions that reproductive females of eusocial bees experience over their sexual capability, we can get evidence on reproductive strategies they adopt. In stingless bees, a tribe of eusocial bees, the reproductive strategies seem to vary as much as their number of species. Our goal was to describe the development of sexual attractiveness of virgin queens of *Melipona flavolineata* throughout adulthood, and test it in different social contexts. Thus, a total of 124 virgin queens were distributed in two groups of experiments. In the first queens were placed in 64 minicolonies, where they were kept until they reach certain ages (categories: 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 18). Then, the queens were subjected to six different social contexts, with a variation in the number of workers and virgin queens present, where they were maintained for six days. When they had reached the stipulated age, sexual attractiveness of queens was tested by means of your individual submission on 10 sexually mature drones in a mating arena. The virgin queens become sexually attractive from the third day of age, remaining attractive up to 18 days. Isolated queens from social contexts did not become attractive, differing greatly from queens who have experienced complex social settings such as minicolonies. We show that attractiveness (number of males attempts) and sexual receptivity (effective matings) develop in adulthood. The level of attractiveness is maintained at this phase and may change as a result of experienced social context. With the investigation of sexual capability, at different times of life of the queens we could get behavioral evidence about a possible reproductive strategy in *Melipona*. This strategy is that the queens must be always ready to mate, by maintaining constant its attractiveness and sexual receptivity for as long as possible. Moreover, we demonstrated the importance of social interactions on the development of sexual traits of virgin queens, which should be adequate to enable them to develop their reproductive capacities.

Keywords: sexual capacity, social isolation, interaction, minicolony, reproductive strategy.

Introdução

“Ela, que chega agora de outro mundo, está ainda atordoada, um tanto pálida, vacilante. Tem o aspecto débil de um velhinho, que fugiu do túmulo. Parece um viajante coberto de poeira de caminhos desconhecidos que levam ao nascimento. Entretanto, é perfeita, dos pés à cabeça, sabe imediatamente tudo que é preciso saber...”

Maurice Maeterlinck (sobre a rainha virgem) em A vida das abelhas.

As sociedades avançadas de abelhas são compostas por dois tipos de fêmeas, as operárias e a rainha. Enquanto às primeiras cabem as funções de manutenção do ninho e cuidados com a prole, à última cabe a postura dos ovos (Michener, 1969; Wilson, 1971), e manutenção da coesão da colônia. A rainha é morfo-fisiologicamente moldada para desempenhar apenas a sua função. No lugar das modificações nas pernas para a coleta de recursos (corbículas, nas operárias), a rainha apresenta finas tíbias (Michener, 2007); em vez de um aparelho reprodutor atrofiado ou pouco desenvolvido, apresentam numerosos ovaríolos bem formados (Seeley, 1985; Cruz-Landim, 2009); e, diferentemente das operárias, realizam a cópula em um voo nupcial, e são cortejadas por zangões (Michener, 1969; 2007).

As fêmeas reprodutivas que ainda não acasalaram, são denominadas rainhas virgens. A produção dessas rainhas, em geral, é controlada pela colônia, através de decisões das operárias (Seeley, 1985; Faustino et al., 2002). Contudo, em Meliponini (ou abelhas sem ferrão), uma tribo de abelhas eussociais avançadas (Michener, 2013), existe um gênero no qual a produção de rainhas virgens foge ao controle das operárias, o gênero *Melipona*. Nas colmeias desse grupo, as novas rainhas são produzidas em grandes quantidades (Kerr, 1950; Wenseleers & Ratnieks, 2004), e constantemente (Santos-Filho et al., 2006), em especial devido a uma regulação genético-alimentar, que ainda não é plenamente conhecida (Kerr, 1950; Hartfelder et al., 2006).

As rainhas virgens emergem sexualmente maduras (com óvulos prontos para a fecundação), pouco ativas, e sem sinais de atratividade sexual (Imperatriz-Fonseca &

Zucchi, 1995). A atratividade, bem como a receptividade, é adquirida ao longo da fase adulta, e é indicada por traços fisiológicos (e. g. como a produção de compostos químicos atrativos; Grajales-Conesa et al., 2006; Fierro et al., 2011), morfológicos (e. g. distensão abdominal; Veen et al., 1999; Kärcher et al., 2013) e comportamentais (e. g. comportamentos ritualizados, como o de girar repetidamente em torno do próprio eixo; revisado por Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995). As rainhas atrativas podem gerar comportamentos específicos em outros indivíduos. Nas operárias, podem estimular tanto a formação de corte (ao redor da rainha), como a perseguição e a própria execução (Wenseleers et al., 2004; Jarau et al., 2009). Ao saírem para o voo nupcial ou em condições artificiais, atraem os machos para si, e estimulam o comportamento de cópula (Camargo, 1972; Engels & Engels, 1988; Imperatriz-Fonseca et al., 1998).

As rainhas de *Melipona* acasalam apenas uma vez, com um único macho, sendo assim, monândricas (Strassmann, 2001; Jaffé et al., 2014). Além disso, como nas demais abelhas sem ferrão, suas colônias apresentam apenas uma rainha dominante (Michener, 2007), com exceção de *Melipona bicolor* (Velthuis et al., 2006). Percebemos, então, que a possibilidade de uma rainha ser reprodutivamente bem-sucedida, dentre tantas outras, se torna mais restrita a cada passo que dá em direção à fisogastría. É esperado, portanto, que a elevada quantidade de rainhas virgens produzidas gera uma intensa competição por oportunidades reprodutivas (Koedam et al., 1995; Van Veen et al., 1999; Kärcher et al., 2013).

A competição entre rainhas, assim como outros tipos de interação proporcionados pelo contexto social, pode resultar no desenvolvimento da aptidão reprodutiva dessas fêmeas. Em estudos sobre biologia reprodutiva de rainhas virgens, o efeito dessas interações tem sido demonstrado pontualmente e de forma experimental em algumas espécies, como *Schwarziana quadripunctata* (Imperatriz-Fonseca, 1973) e *Tetragonisca angustula* (Santos, 2012). Nessas espécies, ambos os autores observaram que o contato entre rainhas resulta em rainhas que apresentam comportamentos associados à atratividade sexual (e. g. distensão abdominal). Entretanto, a relação entre diferentes níveis de interação social e a atratividade sexual das rainhas virgens não tem sido sistematicamente investigada.

Outro fator relevante no desenvolvimento da aptidão reprodutiva é a idade. Em outros gêneros de abelhas sem ferrão (excetuando-se as *Melipona*), como em *Scaptotrigona postica* (Engels & Engels, 1988) e *T. angustula* (Santos, 2012), as rainhas virgens apresentam um pico de atratividade. Nessas espécies, o período de pigmentação da cutícula coincide com o ápice da atratividade (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995), e esta tem estreita relação com a faixa etária em que as rainhas se encontram, entre 10 e 14 dias de idade (Engels & Engels, 1988; Engels et al., 1993; Santos, 2012).

Ao investigar o efeito da idade, e das interações sociais que vivenciam, sobre a sua aptidão reprodutiva, podemos obter evidências sobre as estratégias reprodutivas adotadas pelas rainhas do gênero *Melipona*, quando ainda se encontram no ninho. Assim, é possível contrastá-las com as estratégias de outras espécies de abelhas sem ferrão que, como vem sendo constatado, parecem ser bem diferentes (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995) e surpreendentes (Wenseleers et al., 2011; Van Oystaeyen et al., 2013). Portanto, nosso objetivo foi responder às seguintes perguntas, em relação a uma espécie de meliponíneo: a) Em que idade as rainhas virgens se tornam sexualmente atrativas? Existe um pico de atratividade, como ocorre em outros meliponíneos (não-*Melipona*)?; b) Existe relação entre o contexto social vivenciado e a manifestação da atratividade sexual? Dessa forma, enquanto na primeira parte fornecemos dados descritivos sobre o desenvolvimento da atratividade sexual das rainhas virgens de uma espécie de *Melipona*, no segundo apresentamos resultados experimentais sobre a relevância do contexto social para a aptidão reprodutiva de fêmeas, nesse grupo de abelhas eussociais.

Material e métodos

Área de estudo e espécie estudada

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA, Brasil; 1°26'11.2"S, 48°26'35.50"W), entre os meses de Junho e Setembro de 2014. A paisagem local é caracterizada pela presença de remanescentes florestais e por áreas de cultivos agrícolas. O clima da região é do tipo *Af* (classificação climática de Köppen-Geiger), caracterizado por altas temperaturas e precipitação mínima de 60 mm nos meses mais secos do ano (Peel et al., 2007).

A espécie estudada foi a abelha sem ferrão *M. flavolineata*, conhecida popularmente como uruçú-amarela. Essa é uma espécie de distribuição restrita ao Brasil (Silveira et al., 2002), ocorrendo nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins (Pedro, 2014). A produção de rainhas virgens ocorre durante todo o ano, variando em quantidade entre as estações (Santos-Filho et al., 2006; Ferreira et al., 2013). Ao longo de um dia, nascem diversas rainhas virgens que, na presença da rainha fisogástrica, são perseguidas e eliminadas em poucas horas ou dias, como ocorre em outras espécies de *Melipona* (Koedam et al., 1995; Kärcher et al., 2013).

Procedimentos gerais

Obtenção de indivíduos

As rainhas virgens utilizadas nos experimentos foram obtidas a partir de favos de cria nascentes (ou maduros). Para tanto, foram coletados 10 discos maduros, provenientes de colônias diferentes, para obtermos rainhas virgens recém-emergidas e, portanto, termos conhecimento de suas idades. Todas as rainhas emergidas em um intervalo de 24h foram acondicionadas em uma placa de Petri, contendo alimento *ad libitum* e algumas operárias jovens (Figura 1a). Tal procedimento foi repetido sempre que necessário, para a obtenção de novas rainhas.

Por sua vez, os machos utilizados na última etapa dos experimentos foram obtidos de agregações reprodutivas localizadas próximo às colônias co-específicas. Por

encontrarem-se no ambiente, assumimos que todos os machos utilizados estavam sexualmente maduros (Capítulo 1).

Acondicionamento de rainhas virgens em laboratório

As rainhas virgens foram acondicionadas em laboratório em dois métodos de criação: a) minicolônias confinadas; e b) placas de Petri. As minicolônias foram fundadas em caixas de madeira com dimensões de 14 cm x 14 cm x 6 cm, contendo cerume, um pote de pólen, mel de *Apis mellifera* (ofertado diariamente em tubo eppendorf com volume de 5 ml), cerca de 40 operárias (com diferentes idades, porém ainda incapazes de voar), e um disco de cria novo (contendo ovos recém-ovipositados) (Figura 1b). Diariamente, foram adicionadas cinco operárias recém-emergidas, para simular a constante substituição de indivíduos que ocorre dentro de uma colônia. Quando as operárias já estavam aptas a voar, eram liberadas da colônia. É importante destacar que as abelhas estiveram confinadas dentro da minicolônia, portanto sem acesso ao ambiente externo à caixa de madeira.

O acondicionamento em placas de Petri foi um sistema alternativo de criação em laboratório. Foram utilizadas placas de Petri com diâmetro de 9 cm, e altura de 1,2 cm. O pólen e o mel foram ofertados em microtubos eppendorf de 1,5 ml. As placas foram mantidas em estufa B.O.D. (28°C).

A manutenção dos sistemas de confinamento das abelhas foi realizada diariamente, consistindo na reposição dos alimentos ofertados, retirada de resíduos (lixo e fezes), e registro de possíveis mortes de indivíduos. Antes dos procedimentos de manutenção, o comportamento das rainhas virgens foi observado por algum tempo, com o objetivo de caracterizar/diferenciar qualitativamente os diferentes sistemas de confinamento.

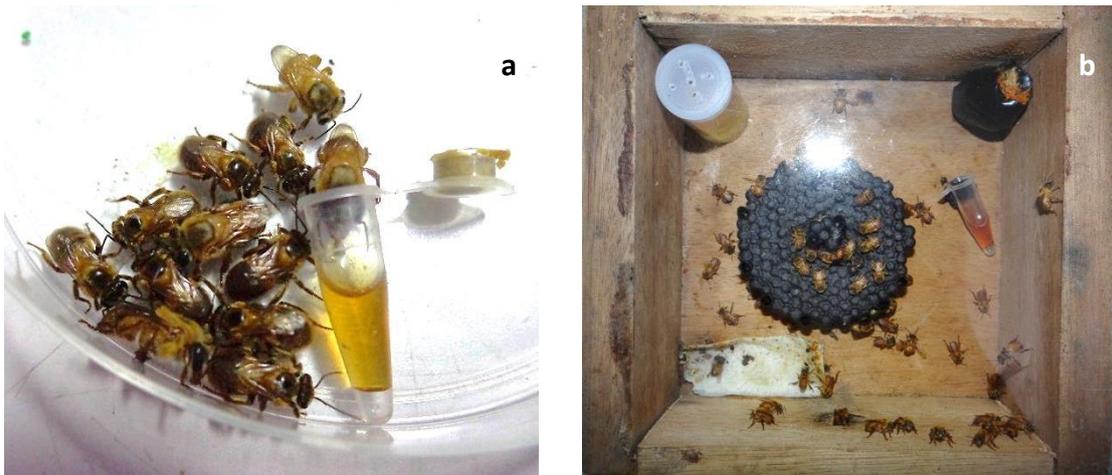


Figura 1 – a) Rainhas virgens recém-emergidas de *Melipona flavolineata* acondicionadas em placa de Petri com acesso *ad libitum* a pólen e mel; b) Exemplo do sistema de acondicionamento de abelhas em minicolônia confinada. Fotos: Epifânia de Macêdo (a), Jamille Veiga (b).

Desenho experimental

Em que idade as rainhas virgens se tornam sexualmente atrativas?

Nesse experimento o objetivo foi testar em que idade as rainhas virgens se tornam sexualmente atrativas para os machos. Para tanto, as rainhas foram mantidas em laboratório, a fim de acompanharmos o desenvolvimento de sua atratividade sexual na fase adulta, e testá-la em diferentes momentos.

Um total de 64 rainhas virgens foi distribuído em minicolônias confinadas, destinadas a viver até determinada quantidade de dias, correspondente a sete categorias de idade: 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias. Excetuando-se as rainhas da categoria zero dia (com menos de 24h de emergidas), todas foram introduzidas, uma a uma, em minicolônias distintas, logo após a sua emergência. Antes de introduzi-las, cada rainha virgem teve suas asas cortadas à metade, com o objetivo de impedir fugas durante os procedimentos.

Ao atingirem a classe de idade estabelecida, testamos a atratividade sexual de cada rainha virgem. O teste consistiu na apresentação individual das rainhas a 10

machos sexualmente maduros da mesma espécie (capturados de agregados reprodutivos), em uma arena de cópula confinada. A arena de cópula utilizada foi uma caixa de madeira (dimensões: 12 cm x 12 cm x 6 cm), coberta por uma lâmina de vidro, assim permitindo a visualização do seu interior. Em arena confinada, cada teste foi conduzido utilizando-se dez machos, e teve duração de três minutos. Nesse tempo, contabilizamos o número de tentativas de cópula com a rainha. Nenhum macho foi reutilizado em réplicas subsequentes.

Consideramos como o nível de atratividade das rainhas o número de machos que tentaram copular com elas. Nessa tentativa, muitos machos acabavam liberando suas genitálias. Uma vez que esse endófalo é liberado (Figura 2a), ele não retorna à sua posição anterior, sendo então perdido (Figura 2b). Dessa forma, cada macho tem apenas uma tentativa/chance de cópula. Logo, consideramos o número de tentativas de cópula igual ao número de machos que perderam suas genitálias internas.

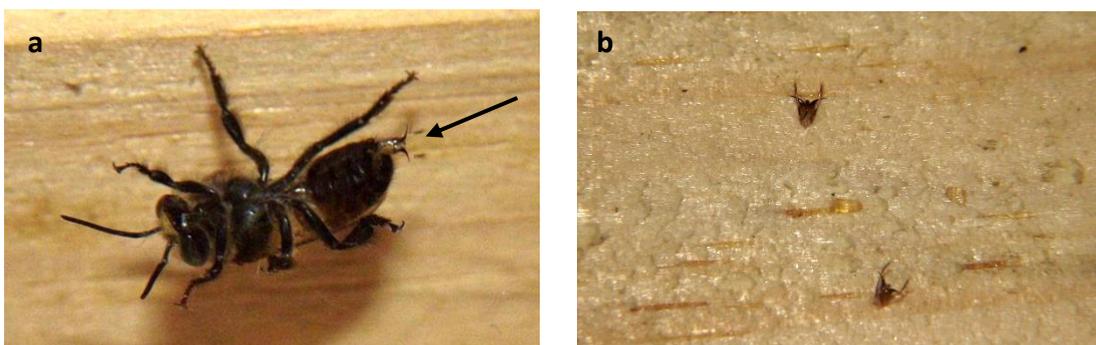


Figura 2 – a) Macho de *Melipona flavolineata* após tentativa de cópula, apresentando o endófalo evertido (genitália liberada), indicado pela seta; b) Endófalos liberados e perdidos por machos, sobre o chão da arena de cópula. Fotos: Cristiano Menezes.

Com esse experimento visamos testar o efeito de diferentes contextos sociais na atratividade sexual de rainhas virgens. Para tanto, rainhas virgens foram mantidas em laboratório, submetidas a diferentes tratamentos de contexto social para acompanharmos o desenvolvimento de sua atratividade, e testá-la em determinado momento. Os tratamentos consistiram na variação do número de rainhas virgens e operárias, em diferentes combinações (Tabela 1).

Um total de 60 rainhas virgens foi distribuído em sistemas de criação confinados. As rainhas experimentais foram introduzidas individualmente em placas de Petri ou minicolônias diferentes. Antes da introdução, cada uma teve suas asas cortadas à metade, no intuito de impedir fugas.

Cada tratamento foi montado com rainhas recém-emergidas, as quais permaneceram em diferentes níveis de condição social até seis dias após a emergência. Ao atingirem essa idade, a atratividade sexual foi testada através do método usado no experimento anterior (apresentação individual de cada rainha a dez machos maduros diferentes, em uma arena de cópula confinada).

Nos tratamentos com duas rainhas virgens, sempre foram acondicionadas rainhas emergidas no mesmo dia, porém de origens diferentes. Ao completarem seis dias de vida, testamos o nível de atratividade de ambas. Para a realização dos testes estatísticos, utilizamos apenas os dados referentes às rainhas que atraíram machos. Se numa dupla de rainhas nenhuma provocou eversões em machos ou o mesmo número de eversões, a primeira foi escolhida para ser incluída nas análises.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos correspondentes aos diferentes níveis de contexto social, em que foram mantidas as rainhas virgens de *Melipona flavolineata* durante seis dias após a emergência.

Tratamento	Descrição do tratamento	Condição de criação	Significado do tratamento
C1	Rainha virgem sozinha (n = 10)	Placa de Petri	Sem contexto colonial
C2	Rainha virgem acompanhada de 10 operárias jovens (n = 10)	Placa de Petri	Contexto social mínimo
C3	Rainha virgem acompanhada de outra rainha virgem (n = 10)	Placa de Petri	Competição entre rainhas virgens
C4	Duas rainhas virgens acompanhadas de 10 operárias jovens (n = 10)	Placa de Petri	Contexto mínimo e competição entre rainhas virgens
C5	Rainha virgem acompanhada de várias operárias (n = 10)	Minicolônia	Contexto social completo
C6	Duas rainhas virgens acompanhadas de várias operárias (n = 10)	Minicolônia	Contexto social completo e competição entre rainhas virgens

Análise dos dados

Para testar em que idade, e sob quais condições, as rainhas virgens de *M. flavolineata* se tornaram sexualmente atrativas, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, e o teste *a posteriori* de comparação múltipla de ranks. Escolhemos esses testes uma vez que as amostras não atenderam aos pressupostos do teste paramétrico, mesmo tendo sido transformadas (Siegel & Castellan Jr., 2006).

Resultados

Comportamento de rainhas virgens em condições de laboratório

Em condições de confinamento, observamos que as rainhas virgens mantidas em minicolônias realizaram os seguintes comportamentos: a) andar sobre as operárias; b) inflar o abdome; c) correr pela caixa e bater as asas ritmicamente; d) girar repetidamente em torno do próprio eixo; e) realizar trofaláxis com operárias; f) realizar trofaláxis com outras rainhas virgens (somente nos tratamentos com duas rainhas) (para visualizar os comportamentos, acesse: <http://migre.me/oPhzo>).

Registramos também a formação de corte de operárias ao redor de rainhas dominantes, e a perseguição de algumas rainhas virgens, somente por operárias, principalmente nos tratamentos com duas rainhas (para visualizar uma rainha virgem sendo rejeitada, acesse: <http://migre.me/oPhpp>). Exclusivamente em algumas minicolônias, observamos a construção de células de cria, e sua inspeção por rainhas virgens (para visualizar o comportamento, acesse: <http://migre.me/oPhsW>). Em placas de Petri (tratamentos com operárias), observamos todos os comportamentos citados, exceto as rainhas andarem sobre as operárias e a formação de corte ao redor das rainhas. O comportamento de a rainha realizar movimentos circulares repetidos, em torno do próprio eixo, também foi registrado no contexto *C3: Rainha virgem acompanhada de outra rainha virgem*.

Em que idade as rainhas virgens se tornam sexualmente atrativas?

Dos 64 testes realizados com rainhas virgens em diferentes idades, 44 delas (68,75%) se tornaram atrativas (provocaram eversões em machos sexualmente maduros), havendo acasalamentos efetivos em 12,5% (n = 8) dos eventos. As idades em que se efetivaram os acasalamentos foram: 03 dias (n = 3); 06 dias (n = 2); 15 dias (n = 2) e 18 dias (n = 1).

Exceto em recém-emergidas (zero dia de idade), constatamos que as rainhas virgens se tornaram sexualmente atrativas em todas as classes de idades. Houve

diferença no nível de atratividade entre rainhas pertencentes a diferentes categorias (KW-H (6;64) = 22,775; $p = 0,0009$). A categoria *0 dias* foi a que mais diferiu das demais, uma vez que essas rainhas não manifestaram atratividade (Figura 3).

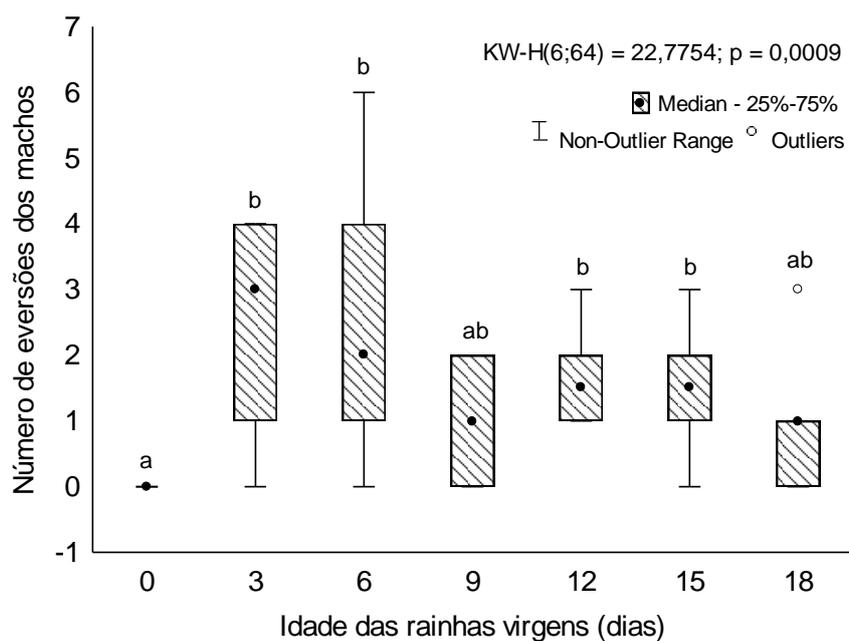


Figura 3 – Atratividade de rainhas virgens de *Melipona flavolineata*, medida em número de eversões de machos, em diferentes idades. O ponto central e o box-plot indicam a mediana e a variação das amostras numa faixa de 25% a 75%. A linha vertical representa os limites das amostras (com exceção dos outliers), e o círculo vazado, os valores dos outliers. As letras indicam diferenças significativas entre os ranks das categorias de idade, a um nível de significância de 5%.

Qual o efeito do contexto social sobre a atratividade sexual das rainhas virgens?

Dos 60 testes realizados com rainhas com seis dias de idade, em diferentes contextos sociais, 40% (n = 24) se tornaram sexualmente atrativas, ocorrendo cópulas efetivas em 1,66% dos eventos (n = 1; contexto social C2: rainha virgem acompanhada de 10 operárias, em placa de Petri). Observamos que houve diferença na atratividade de rainhas virgens provenientes de diferentes contextos sociais (KW-H_(5,60) = 24,624; p = 0,0002). As rainhas pertencentes ao contexto de minicolônias (com ou sem competição com outra rainha, respectivamente C5 e C6) provocaram maior número de eversões em machos maduros, quando comparadas com as demais (Figura 4). Constatamos ainda que nenhuma das rainhas virgens sem contexto social (C1) se tornou atrativa (Figura 4).

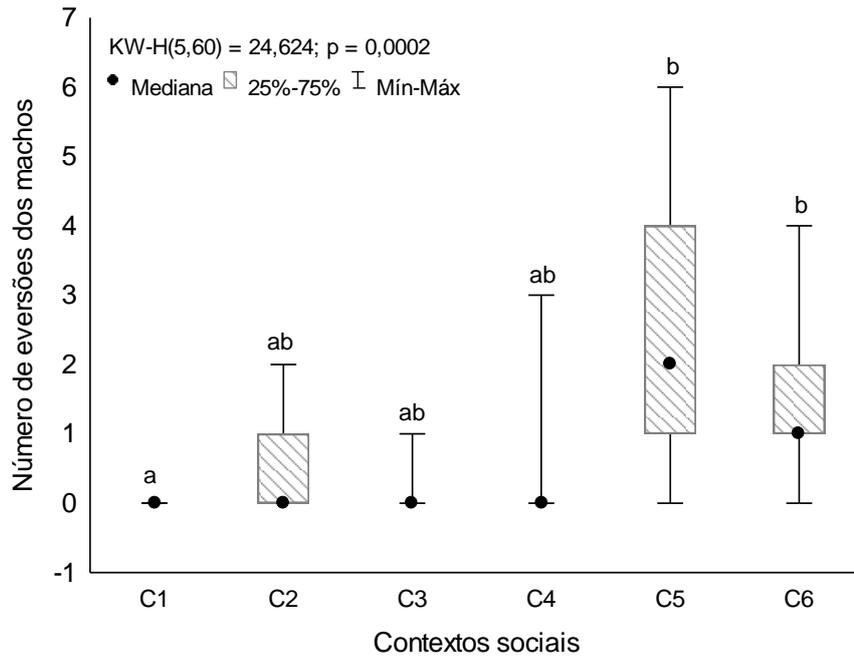


Figura 4 – Atratividade sexual (medida em número de eversões de machos maduros) de rainhas virgens de *M. flavolineata* com 06 dias de idade, pertencentes a diferentes contextos sociais. C1: Rainha virgem sozinha em placa de Petri; C2: Rainha virgem acompanhada de 10 operárias jovens em placa de Petri; C3: Rainha virgem acompanhada de outra rainha virgem em placa de Petri; C4: Duas rainhas virgens acompanhadas de 10 operárias jovens em placa de Petri; C5: Rainha virgem em contexto de minicolônia; C6: Duas rainhas virgens em contexto de minicolônia. O ponto central e o box-plot indicam a mediana e a variação das amostras numa faixa de 25% a 75%, respectivamente. A linha vertical representa os limites máximo e mínimo das amostras. As letras indicam diferenças significativas entre os ranks das categorias ao nível de 5%.

Discussão

Os comportamentos observados em rainhas criadas em confinamento está de acordo com outros estudos sobre o comportamento delas em condições não artificiais (revisado por Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995). Mesmo com as asas cortadas, todo o repertório comportamental de dominância de rainhas virgens foi observado nas minicolônias experimentais, incluindo os movimentos circulares em torno do próprio eixo, e a formação de corte por operárias (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995; Koedam et al., 1995; Jarau et al., 2009; Kärcher et al., 2013).

Uma vez que os comportamentos observados nas condições artificiais, às quais as rainhas foram submetidas, estão de acordo com os comportamentos já registrados em condições normais, concluímos que nossa abordagem experimental não alterou o repertório comportamental esperado para a espécie. Portanto, os resultados podem ser interpretados sob uma perspectiva ecológica e evolutiva, já que não constituem um artefato derivado de manipulação.

Aptidão reprodutiva de rainhas virgens em diferentes idades

Demonstramos que a atratividade (tentativas dos machos) e a receptividade (acasalamentos efetivos) sexual das rainhas virgens de *M. flavolineata* se desenvolvem na fase adulta, entretanto não são traços influenciados pela idade. O nível de atratividade se mantém em diferentes momentos e pode se modificar em consequência do contexto social vivenciado pelas rainhas após emergirem. Embora pigmentadas e comportamentalmente ativas, as rainhas virgens de *Melipona* não emergem atrativas (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995), como também pudemos observar. Diferentemente do que esperávamos as rainhas virgens dessa espécie não apresentam um pico de atratividade ao longo da vida adulta. Ao contrário, observamos que as rainhas foram capazes de gerar respostas específicas em machos (e. g. tentativa de cópula) quando ainda muito jovens, mantendo-se atrativas e receptivas durante vários dias (entre três e 18 dias de idade).

Interpretamos a manifestação da aptidão reprodutiva logo nos primeiros dias de vida (da fase adulta) como uma antecipação. Quando comparadas com outros gêneros

de abelhas sem ferrão (não-*Melipona*), nota-se que as rainhas de *Melipona* desenvolvem a atratividade muito mais rápido. Em *S. postica* (Engels & Engels, 1988; Engels et al., 1997) as rainhas se tornam atrativas entre 10 e 12 dias, e em *T. angustula*, entre 12 e 14 dias (Santos, 2012). Em ambas as espécies, as rainhas levam cerca de três a quatro vezes mais tempo que as rainhas de *M. flavolineata* (ver Resultados). A antecipação da aptidão reprodutiva também foi registrada em outras *Melipona*, por exemplo, em *M. quadrifasciata* e *M. favosa*, em que Silva et al. (1972) e Sommeijer et al. (2003), respectivamente, observaram rainhas virgens entre um e oito dias de idade sendo aceitas em colônias órfãs, e saindo do ninho para realização do voo nupcial. Camargo (1972), em seu estudo sobre acasalamentos em condições controladas, obteve cópulas bem-sucedidas de *M. quadrifasciata*, utilizando rainhas virgens ainda mais jovens, com menos de 24h de emergidas.

A manifestação antecipada da atratividade e da receptividade sexual em rainhas virgens de *Melipona* (Camargo, 1976; Sommeijer et al., 2003; ver Resultados) pode se dar em consequência da intensa competição a que estão submetidas rainhas pertencentes à mesma colônia (Koedam et al., 1995; Velthuis et al., 2006; Kärcher et al., 2013). Nos ninhos desse gênero, onde rainhas virgens são produzidas em abundância (Kerr, 1950; Wenseleers & Ratnieks, 2004; Santos-Filho et al., 2006), as pressões competitivas por oportunidades reprodutivas são grandes. O estabelecimento de complexas hierarquias entre as rainhas (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995) e a constante perseguição dessas rainhas pelas operárias (Koedam et al. 1995; Wenseleers et al., 2004; Jarau et al., 2009), podem ser entendidos como resultado dessas pressões. Nesse contexto de acirrada competição, e considerando que as rainhas competem por oportunidades de se reproduzir, aquelas que se mostrarem reprodutivamente aptas no menor tempo, possivelmente obterão vantagens em relação às competidoras.

Levantamos, portanto, a seguinte questão: nessa competitiva corrida por oportunidades reprodutivas, qual o momento certo para uma rainha se tornar apta para o acasalamento? Certamente seria na ausência de uma rainha fisogástrica, e. g. um contexto de substituição (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995; Kärcher et al., 2013), ou em eventos dos quais a rainha-mãe não poderia participar, e. g. enxameação

(Sakagami, 1982; Van Veen & Sommeijer, 2000), ou parasitismo reprodutivo de outros ninhos (Wenseleers et al., 2011; Van Oystaeyen et al., 2013). Entretanto, até onde sabemos as rainhas virgens não têm como prever a ocorrência de tais oportunidades, de forma que devem contar apenas com a sorte de estarem disponíveis no momento propício (Kärcher et al., 2013).

Portanto, as rainhas virgens precisam estar “sempre prontas” (reprodutivamente aptas) para “aproveitarem” estas imprevisíveis oportunidades. Essa estratégia provavelmente complementa o comportamento das rainhas de se esconderem em diferentes refúgios dentro do ninho (Kleinert & Imperatriz-Fonseca, 1994; Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995; Kärcher et al., 2013). Esse comportamento tem sido interpretado como uma evidência de que as rainhas virgens de *Melipona* “aguardam” a oportunidade de se reproduzir, mantendo-se em segurança dentro de potes de alimento vazios, lamelas de cerume ou frestas do ninho (Kleinert & Imperatriz-Fonseca, 1994; Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995). Mais uma vez, essa estratégia é contrastante com aquela adotada por outros gêneros de meliponíneos em que, no geral, as rainhas demoram a desenvolver atratividade. Em gêneros como *Frieseomelitta*, *Friesella*, *Plebeia*, *Schwarziana*, *Scaura* e *Tetragonisca*, as rainhas virgens são mantidas em câmaras reais (Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995), o que representa uma forma da colônia garantir a presença de fêmeas reprodutivas (reprodutivamente aptas e prontas para o voo), no intuito de reativar a postura em caso de orfandade, ou mesmo fornecer uma nova rainha para a enxameação.

A constância na atratividade e na receptividade sexual ao longo da vida adulta, aqui demonstrada em *M. flavolineata*, reforça a interpretação dos nossos resultados como uma estratégia das rainhas de estarem “sempre prontas” para o acasalamento. Considerando, novamente, que as oportunidades reprodutivas são imprevisíveis, é esperado que as rainhas mantenham-se reprodutivamente aptas o máximo de tempo possível. Já para as colônias, ter rainhas virgens aptas para acasalar e disponíveis por longos períodos, pode representar uma vantagem, pois uma oportunidade reprodutiva para a rainha virgem necessariamente é uma oportunidade reprodutiva para a colônia.

Aptidão reprodutiva de rainhas virgens e o contexto social

Esse foi o primeiro estudo que testou sistematicamente o efeito do contexto social sobre a aptidão reprodutiva (atratividade e receptividade) de fêmeas reprodutivas em meliponíneos. Por meio dele, demonstramos que o contexto vivenciado pelas rainhas virgens é um fator determinante para se tornarem aptas para o acasalamento. Na ausência de interações (sem contexto social), nenhuma das rainhas se tornou atrativa, e tão pouco, receptiva. Por outro lado, aquelas que vivenciaram diferentes contextos e, portanto, variados níveis de interação social, desenvolveram sua atratividade, e muitas chegaram a acasalar de fato.

Dois conjuntos de fatores atuam no desencadeamento da aptidão reprodutiva de um indivíduo: fatores internos (fisiológicos) e fatores externos (resultantes da interação social e seus desdobramentos) (Alcock, 2001). Demonstramos que na espécie estudada, os fatores externos tiveram maior influência sobre a competência reprodutiva das rainhas. Mesmo emergindo com o potencial fisiológico para acasalarem (fatores internos: *e. g.* ovários desenvolvidos, Cruz-Landim, 2009), aquelas rainhas que foram mantidas isoladas de um contexto social (fator externo) não se tornaram reprodutivamente aptas.

Ficou clara a influência do contexto social sobre a aptidão reprodutiva das rainhas. A atratividade diferiu completamente entre os contextos extremos, *ausência de operárias e minicolônias* (com ou sem a presença de outra rainha), não havendo uma relação direta entre a competência sexual das rainhas e a complexidade dos diferentes contextos sociais. Destacamos ainda que a mínima interação (C3: rainha com rainha, ambas virgens) resultou em fêmeas capazes de atrair machos, mesmo que em menor proporção.

Os zangões não foram atraídos por rainhas que nunca participaram de interações sociais, mas tentaram copular com as rainhas que vivenciaram diferentes contextos. Uma vez que o interesse dos machos por rainhas é mediado por sinalizações químicas específicas, através de feromônios sexuais produzidos por elas (Ayasse et al., 2001; Fierro et al., 2011), podemos supor que as rainhas que não se tornaram atrativas não produziram tais compostos. Novos experimentos devem ser realizados para

demonstrar se esses compostos de fato não são produzidos por rainhas isoladas do contexto social.

Com a investigação da aptidão reprodutiva, em diferentes momentos da vida das rainhas, conseguimos obter evidências comportamentais sobre uma possível estratégia reprodutiva em *Melipona*. Essa estratégia consiste em que as rainhas estejam *sempre prontas* para acasalar, ou seja, mantendo constante a sua atratividade e a receptividade sexual o máximo de tempo possível. Além disso, demonstramos a importância das interações sociais sobre o desenvolvimento da aptidão reprodutiva de rainhas virgens, que devem ser adequadas para que elas desenvolvam suas capacidades reprodutivas.

Referências

- ALCOCK, J. (2001) *Animal Behavior: An Evolutionary Approach*. p. 494, 7th edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- AYASSE, M., PAXTON, R. & TENGÖ, J. (2001) Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 31–78.
- CAMARGO, C.A. (1972) Mating of the social bee *Melipona quadrifasciata* under controlled conditions (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 45, 520–523.
- CRUZ-LANDIM, C. (2009) *Abelhas: Morfologia e Função de Sistemas*. p. 408. Editora UNESP, São Paulo.
- ENGELS, E. & ENGELS, W. (1988) Age-dependent queen attractiveness for drones and mating in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Journal of Apicultural Research*, 27, 3–8.
- ENGELS, E., ENGELS, W., LÜBKE, G., SCHRÖDER, W. & FRANCKE, W. (1993) Age-related patterns of volatile cephalic constituents in queens of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* Latr (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 24, 539–548.
- ENGELS, W., ENGELS, E. & FRANCKE, W. (1997) Ontogeny of cephalic volatile patterns in queens and mating biology of the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 31, 251–256.
- FAUSTINO, C.D., SILVA-MATOS, E. V., MATEUS, S. & ZUCCHI, R. (2002) First record of emergency queen rearing in stingless bees (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 49, 111–113.
- FERREIRA, N.T., BLOCHTEIN, B. & SERRÃO, J.E. (2013) Seasonal production and spatial distribution of *Melipona bicolor schencki* (Apidae; Meliponini) castes in brood combs in southern Brazil. *Apidologie*, 44, 176–187.
- FIERRO, M.M., CRUZ-LÓPEZ, L., SÁNCHEZ, D., VILLANUEVA-GUTIÉRREZ, R. & VANDAME, R. (2011) Queen Volatiles as a modulator of *Tetragonisca angustula* drone behavior. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 1255–1262.
- GRAJALES-CONESA, J., ROJAS, J.C. & GUZMAN-DIAZ, M. (2006) Cephalic and Dufour gland secretions of *Scaptotrigona mexicana* queens: Chemical composition and biological activity. *Apidologie*, 38, 38–46.
- HARTFELDER, K., MARKER, G.R., JUDICE, C.C., PEREIRA, G.A.G., SANTANA, W.C., DALLACQUA, R. & BITTONDI, M.M.G. (2006) Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37, 144–163.

- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (1973) Miscellaneous observations on the behaviour of *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha*, 30, 633–640.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., MATOS, E.T., FERREIRA, F. & VELTHUIS, H.H.W. (1998) A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 45, 231–233.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & ZUCCHI, R. (1995) Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. *Apidologie*, 26, 231–244.
- JAFFÉ, R., PIOKER-HARA, F.C., SANTOS, C.F. DOS, SANTIAGO, L.R., ALVES, D.A., KLEINERT, A.M.P., ET AL. (2014) Monogamy in large bee societies: a stingless paradox. *Die Naturwissenschaften*, 101, 261–264.
- JARAU, S., VAN VEEN, J.W., AGUILAR, I. & AYASSE, M. (2009) Virgin queen execution in the stingless bee *Melipona beecheii*: The sign stimulus for worker attacks. *Apidologie*, 40, 496–507.
- KÄRCHER, M.H., MENEZES, C., ALVES, D.A., BEVERIDGE, O.S., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & RATNIEKS, F.L.W. (2013) Factors influencing survival duration and choice of virgin queens in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Die Naturwissenschaften*, 100, 571–580.
- KERR, W.E. (1950) Genetic determination of castes in the genus *Melipona*. *Genetics*, 143–152.
- KLEINERT, A.M.P. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (1994) Virgin queens refuges in colonies of *Melipona marginata* (Apidae, Meliponinae). *Brazilian Journal of Biology*, 54, 247–251.
- KOEDAM, D., AGUILAR MONGE, I. & SOMMEIJER, M.J. (1995) Social interactions of gynes and their longevity in queenright colonies of *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae). *Netherlands Journal of Zoology*, 45, 480–494. *Netherlands Journal of Zoology*.
- MICHENER, C. D. (2007) *The bees of the world*. In p. 953, 2nd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- MICHENER, C. D. (2013) The Meliponini. In *Pot-Honey: A legacy of the stingless bees* pp. 3–17. Springer Science & Business Media, New York.
- MICHENER, C.D. (1969) Comparative social behavior of bees. *Annual Review of Entomology*.
- VAN OYSTAEYEN, A., ARAUJO ALVES, D., CALIARI OLIVEIRA, R., LIMA DO NASCIMENTO, D., SANTOS DO NASCIMENTO, F., BILLEN, J. & WENSELEERS, T. (2013) Sneaky queens in *Melipona* bees selectively detect and infiltrate queenless colonies. *Animal Behaviour*, 86, 603–609.

- PEDRO, S.R.M. (2014) The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera : Apidae). *Sociobiology*, 61, 348–354.
- PEEL, M.C., FINLAYSON, B.L. & MCMAHON, T.A. (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, 11, 1633–1644.
- SAKAGAMI, S. (1982) Stingless Bees. *Social Insects*, v. 3 pp. 361–423.
- SANTOS, C.F. (2012) Biologia reprodutiva das rainhas e machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini). Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado.
- SANTOS-FILHO, P.S., ALVES, D. A., ETEROVIC, A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & KLEINERT, A. M.P. (2006) Numerical investment in sex and caste by stingless bees (Apidae: Meliponini): a comparative analysis. *Apidologie*, 37, 207–221.
- SEELEY, T.D. (1985) Honeybee ecology: a study of adaptation in social life. Princeton University Press.
- SIEGEL, S. & CASTELLAN JR., N.J. (2006) Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. p. 448. 2ª ed. Artmed, Porto Alegre.
- SILVA, D.N. DA, ZUCCHI, R. & KERR, W. E. (1972) Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Animal Behaviour*, 20, 123–132.
- SILVEIRA, F.A., MELO, G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. (2002) Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. In p. 253, 1ª edition. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Araucária, Belo Horizonte, MG.
- SOMMEIJER, M.J., BRUIJN, L.L.M., MEEUWSEN, J.A.J. & SLAA, J. (2003) Reproductive behaviour of stingless bees : nest departures of non-accepted gynes and nuptial flights in *Melipona favosa* (Hymenoptera : Apidae, Meliponini). *Entomologische Berichten*, 63, 7–13.
- STRASSMANN, J. (2001) The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux*, 48, 1–13.
- VEEN, J.W. VAN & SOMMEIJER, M.J. (2000) Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponini), 47, 70–75.
- VAN VEEN, J.W., SOMMEIJER, M.J. & MONGE, I.A. (1999) Behavioural development and abdomen inflation of gynes and newly mated queens of *Melipona beecheii* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 46, 361–365.
- VELTHUIS, H.H.W., VRIES, H.D. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2006) The polygyny of *Melipona bicolor*: scramble competition among queens. *Apidologie*, 37, 222–239.

- WENSELEERS, T., ALVES, D.A., FRANCOY, T.M., BILLEN, J. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2011) Intraspecific queen parasitism in a highly eusocial bee. *Biology Letters*, 7, 173–176.
- WENSELEERS, T., HART, A.G., RATNIEKS, F.L.W. & QUEZADA-EUÁN, J.J.G. (2004) Queen execution and caste conflict in the stingless bee *Melipona beecheii*. *Ethology*, 110, 725–736.
- WENSELEERS, T. & RATNIEKS, F.L.W. (2004) Tragedy of the commons in *Melipona* bees. *Proceedings of The Royal Society London B*, 271, S310–S312.
- WILSON, E.O. (1971) *The Insect Societies*. Harvard, Mass p. 548. Harvard University Press, Cambridge.

CAPÍTULO 3

Acasalamentos em condições artificiais e o controle da cópula por rainhas virgens na abelha sem ferrão *Melipona flavolineata* Friese (Apidae, Meliponini)

Resumo

O custo de um acasalamento entre indivíduos geneticamente relacionados é alto, sendo o caso mais grave entre irmãos. Como consequência do endocruzamento, as colônias de abelhas sem ferrão perdem metade da sua força de trabalho, e a rainha dominante é eliminada em pouco tempo. Tais detalhes da biologia reprodutiva dos meliponíneos, dentre outros, devem ser considerados quando o objetivo é criar técnicas para controlar a reprodução dessas abelhas. A reprodução é uma etapa importante, e dominá-la irá acelerar a fundação de novos ninhos. Entretanto, as técnicas de controle ainda esbarram em lacunas no conhecimento básico sobre essas abelhas, como a habilidade das rainhas virgens em escolher seus parceiros sexuais. O objetivo do nosso estudo foi testar a realização (e o sucesso) de acasalamentos em condições artificiais na espécie *Melipona flavolineata*, e testar se as rainhas virgens são capazes de decidir sobre a ocorrência das cópulas. Um total de 39 rainhas foi distribuído em dois experimentos. No primeiro, 15 rainhas foram apresentadas individualmente a 10 machos sexualmente maduros em arenas de cópula confinadas. A mesma rainha foi utilizada em duas condições fisiológicas: a) normais; e b) inertes (narcotizadas pelo uso de CO₂), resultando em amostras pareadas. No segundo, 24 rainhas virgens foram individualmente apresentadas em dois ambientes: a) em arena de cópula confinada; b) em campo, próximo a um agregado reprodutivo de machos, também resultando em amostras dependentes. Em ambos, foi contabilizado o número de machos que tentou acasalar com as rainhas, bem como a quantidade de acasalamentos efetivos. Durante os testes, observamos que as rainhas virgens impedem a ocorrência de acasalamentos, escolhendo fechar ativamente suas placas genitais. Com isso, a maioria dos machos, na tentativa de copular, liberou o endófalo, sem conseguir inseri-lo nas rainhas virgens. No primeiro experimento, os acasalamentos ocorreram efetivamente somente quando as rainhas estavam inertes (66%; n = 10), impedidas de tomar qualquer decisão em relação aos seus potenciais parceiros. No segundo, ocorreram apenas em campo, com baixo sucesso (8,33%; n =

2). Uma hipótese que poderia explicar esses comportamentos seria que as rainhas estão tentando evitar cópulas com indivíduos geneticamente relacionados. Se elas realmente fazem essa identificação e usam-na como motivo para decidir acasalar ou não, é uma hipótese que ainda precisa ser testada em meliponíneos.

Palavras-chave: comportamento de cópula, arena de acasalamento, eversão do macho, narcose, endocruzamento.

Abstract

The costs of a mating between genetically related individuals is high, the most alarming case being between brothers and sisters. As a result of inbreeding, colonies of stingless bees lose half of its workforce, and the dominant queen is eliminated in a short time. Such details of the reproductive biology of stingless bees, among others, should be considered when the goal is to create techniques to control the reproduction of these bees. Reproduction is an important step, and control it will speed up the foundation of new nests. However, control techniques still run into gaps in basic knowledge on these bees, as the ability of virgin queens in choosing their sexual partners. The aim of our study was to test the performance (and success) of matings in artificial conditions in the species *Melipona flavolineata*, and test whether the virgin queens are able to decide on the occurrence of copulation. A total of 39 queens was distributed in two experiments. In the first, 15 queens were presented individually to 10 sexually mature males in confined mating arenas. The same queen was used in two physiological conditions: a) normal; b) inert (drugged by the use of CO₂), resulting in paired samples. Then, 24 virgin queens were individually presented in two environments: a) confined in mating arena; b) in the field, next to a cluster of reproductive males, also resulting in dependent samples. In both cases, we counted the number of males who tried to mate with the queens and the effective amount of matings. During the tests, we observed virgin queens preventing the occurrence of matings by actively closing their genital plates. Thus, most of the males in an attempt to copulate, released the endophallus, being unable to enter it into the gyne. In the first experiment, matings indeed took place only when the queens were inert (66%; n = 10), prevented from taking any decision in relation to their potential partners. In the second, matings occurred only in the field, with low success (8.33%, n = 2). One hypothesis that could explain these behaviors would be that queens are trying to avoid inbreeding. If they really can identify a related male and use it as a reason to decide to mate or not, is a hypothesis that remains to be tested in stingless bees.

Key words: mating behavior, mating arena, male eversion, narcotizing, inbreeding.

Introdução

A reprodução é a razão final da vida de um organismo. Para os animais que realizam por meio de acasalamentos, ao invés de reprodução assexuada, encontrar o melhor parceiro possível, no momento mais adequado, é imprescindível para o seu sucesso reprodutivo (Johnstone et al., 1996; Cotton et al., 2006; Kempenaers, 2007). Nos grupos em que as fêmeas são monândricas, essa pressão em investir corretamente todo esforço reprodutivo é maior sobre elas (Thornhill & Alcock, 1983; Eberhard, 1996).

Esse é o caso das fêmeas reprodutivas (ou rainhas virgens) das abelhas sem ferrão (Strassmann, 2001; Jaffé et al., 2014), um grupo de abelhas eussociais (Hymenoptera: Apidae: Meliponini; Michener, 2013). Entre os Hymenoptera, a escolha do parceiro sexual tem importância ainda maior no sucesso reprodutivo do indivíduo. A escolha errada por parte da rainha, de um macho com alelo igual ao seu para o gene *csd* (*complementary sex determiner*, em inglês), causará a produção de machos diploides, diminuindo o seu sucesso reprodutivo e no caso específico das abelhas sem ferrão, causará a sua morte (Camargo, 1976; 1979). Portanto, é esperado que essas fêmeas escolham bem o momento para acasalar, assim como o macho que lhe proverá, de uma única vez, a quantidade de espermatozoides que utilizarão para fecundar seus óvulos ao longo de sua vida.

Por ocasião do acasalamento, o macho atraído monta sobre a rainha virgem, imobiliza-a com suas pernas, e tenta insistentemente copular com ela (Camargo, 1972; Engels & Engels, 1988). O seu objetivo é tocar a ponta distal do abdome da fêmea, quando poderá liberar a sua genitália interna (ou endófalo) e fecundá-la. O uso da força pelos machos, na tentativa de dominar as rainhas e isolá-la do contato com outros machos, foi descrito em diferentes espécies: *Melipona quadrifasciata* (Camargo, 1976), *Scaptotrigona postica* (Engels & Engels, 1988), *Tetragonisca angustula* (Imperatriz-Fonseca et al., 1998). Embora a previsão da teoria seja de que, em espécies monândricas, os machos estão sob forte pressão de escolha das fêmeas (Thornhill & Alcock, 1983; Eberhard, 1996), a habilidade das rainhas virgens em fazer essa escolha não tem sido demonstrada nas abelhas sem ferrão. Em teoria, essa é uma habilidade importante por permitir que a rainha eleja, dentre tantas opções, aquele macho que possui qualidades almejavéis para sua prole (Eberhard, 1996; Lüpold et al.,

2014). Mas, principalmente, para ter a capacidade de evitar acasalar com indivíduos indesejáveis, a exemplo de seus irmãos (zangões), com quem compartilham metade do material genético (Cook & Crozier, 1995; Zayed & Packer, 2005; Hedrick et al., 2006).

As rainhas virgens dos meliponíneos, em consequência do voo nupcial seguido de fecundação, retornam para suas colmeias com o endófalco de um macho acoplado em sua câmara vaginal, e expondo duas estruturas ao final do abdome, os gonóstilos (Kerr et al., 1962; Silva et al., 1972), de forma que é possível identificar uma rainha recém-copulada através desse sinal de acasalamento (*mating sign*, em inglês). Mais que uma forma de reconhecermos seu status reprodutivo, o sinal corresponde a uma barreira física à ocorrência de novos acasalamentos. A genitália masculina é uma estrutura esclerotizada (Michener, 1990; 2007), e que se instala profundamente na mucosa vaginal da fêmea (Campos & Melo, 1990; Melo et al., 2001; Menezes, 2010). O macho que deixa esse sinal garante a vitória sobre seus competidores, e acabada morrendo em pouco tempo (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990).

O estudo dos acasalamentos em condições artificiais forneceu muito do que sabemos atualmente sobre o comportamento do par sexual em diferentes espécies de meliponíneos. Machos e fêmeas, aptos para a cópula, foram reunidos em arenas confinadas, como um método para atender a diferentes objetivos. O primeiro deles foi a indução de acasalamentos entre irmãos para se estudar os efeitos do endocruzamento nas colônias de abelhas sem ferrão, usando como modelo experimental a espécie *M. quadrifasciata* (Camargo, 1972). O segundo foi o estudo da atratividade sexual de rainhas virgens de *S. postica*, utilizando como métrica os diferentes níveis de resposta comportamental dos zangões (Engels & Engels, 1988). Por último, o método foi utilizado para atestar a qualidade reprodutiva de rainhas virgens produzidas artificialmente (ou produzidas *in vitro*; Menezes, 2010).

Portanto, o método para controlar as cópulas em abelhas já está estabelecido, incluindo-se os meliponíneos (e.g. *M. quadrifasciata*; Camargo, 1972). Entretanto é preciso testá-lo em diferentes espécies e, se necessário, adequá-lo a cada uma delas. A importância da técnica se justifica pelo fato de que, ao controlar a etapa “reprodução” no ciclo de vida dessas abelhas, é possível acelerar o processo de fundação de novas colônias (Venturieri et al., 2012). Esse é o atual e principal objetivo que se tem com a

criação racional e o manejo das abelhas sem ferrão, atividade econômica conhecida como meliponicultura (Nogueira-Neto, 1953; 1997).

Considerando que o controle da reprodução dos meliponíneos é um tema de interesse prático, mas que ainda esbarra em lacunas no conhecimento básico sobre a biologia de diferentes espécies, o objetivo do nosso estudo foi testar a realização (e o sucesso) de acasalamentos em condições controladas em uma espécie de abelha sem ferrão, e testar se as rainhas virgens são capazes de decidir sobre a ocorrência das cópulas.

Material e métodos

Área de estudo e espécie estudada

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Botânica da Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA, Brasil; 1°26'11.2"S, 48°26'35.50"W), entre Outubro e Novembro dos anos de 2012 e 2014. A paisagem local é caracterizada pela presença de remanescentes florestais e por áreas de cultivos agrícolas. O clima da região é do tipo *Af* (classificação climática de Köppen-Geiger), caracterizado por altas temperaturas e precipitação mínima de 60 mm nos meses mais secos do ano (Peel et al., 2007).

A espécie estudada foi a abelha sem ferrão *Melipona flavolineata*, conhecida popularmente como urucu-amarela. Essa é uma espécie de distribuição restrita ao Brasil (Silveira et al., 2002), ocorrendo nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão e Tocantins (Pedro, 2014). A produção de sexuais ocorre durante todo o ano, variando em quantidade entre as estações (Santos-Filho et al., 2006; Ferreira et al., 2013). Ao longo de um dia, nascem diversas rainhas virgens que, na presença da rainha fisogástrica, são perseguidas e eliminadas em poucas horas ou dias, como ocorre em outras *Melipona* (Koedam et al., 1995; Kärcher et al., 2013). Os machos, por sua vez, ao deixarem os ninhos permanentemente, formam agregações reprodutivas próximas a colônias da mesma espécie (observação pessoal).

Procedimentos gerais

Obtenção de indivíduos

As rainhas virgens utilizadas nos experimentos foram obtidas a partir de favos de cria nascentes (ou maduros). Para tanto, foram coletados 10 favos maduros, provenientes de colônias diferentes, para obtermos rainhas virgens recém-emergidas. Todas as rainhas emergidas em um intervalo de 24h foram acondicionadas em uma placa de Petri, contendo alimento *ad libitum* e algumas operárias jovens. Tal procedimento foi repetido sempre que necessário, para a obtenção de novas rainhas.

Por sua vez, os machos utilizados foram obtidos de agregações reprodutivas localizadas próximas a colônias co-específicas. Por encontrarem-se no ambiente, assumimos que todos os machos estavam sexualmente maduros (ver Capítulo 1 dessa dissertação).

Acondicionamento de rainhas virgens em laboratório

As rainhas virgens receberam marcações coloridas no tórax (com tinta acrílica não tóxica) e foram acondicionadas em minicolônias. Essas foram fundadas em caixas de madeira com dimensões de 14 cm x 14 cm x 6 cm, contendo cerume, um pote de pólen, mel de *Apis mellifera* (ofertado em tubo eppendorf com volume de 5 ml), cerca de 40 operárias (com diferentes idades, porém ainda incapazes de voar) e um favo de cria maduro (contendo abelhas prestes a emergir). À medida que novas abelhas emergiam, identificávamos as rainhas virgens sem marcação no tórax e as eliminávamos. É importante destacar que as abelhas estiveram confinadas dentro da minicolônia, portanto sem acesso ao ambiente externo à caixa de madeira. A manutenção das minicolônias foi realizada diariamente, consistindo na reposição dos alimentos ofertados, retirada de resíduos (lixo e fezes), e registro de possíveis mortes de indivíduos.

Desenho experimental

A seguir são apresentados os procedimentos de dois experimentos: a) acasalamentos com rainhas virgens em diferentes condições fisiológicas (normais ou inertes); b) acasalamentos em diferentes ambientes (campo e em confinamento). Nesses experimentos, tentamos induzir acasalamentos entre rainhas virgens e machos em condições controladas, observando seus comportamentos e registrando a ocorrência de tentativas de cópulas e a de cópulas efetivas.

Acasalamentos com rainhas virgens em diferentes condições fisiológicas

Nesse experimento, tivemos como objetivo testar a realização de acasalamentos controlados com rainhas virgens em diferentes condições fisiológicas. Para tanto, as rainhas foram mantidas em minicolônias confinadas em laboratório, e apresentadas a machos sexualmente maduros, a fim de registrarmos seu nível de atratividade de machos, bem como a realização dos acasalamentos.

Rainhas virgens que indicavam comportamentos de dominância (Capítulo 2) em suas minicolônias de origem, com idades desconhecidas, foram testadas em duas situações: a) em condições normais; b) inertes (narcotizadas pelo uso de dióxido de carbono - CO₂). Para ficarem inertes, as rainhas foram acondicionadas em um tubo de plástico e, em seguida, expostas a um fluxo de CO₂ durante um minuto (Figura 1).

Em testes preliminares sobre o acasalamento em confinamento, observamos que as rainhas virgens fechavam suas placas genitais, como se estivessem escolhendo realizar a cópula ou não. Isso nos fez levantar a hipótese de que pudessem estar impedindo ativamente o acasalamento. Para testá-la, utilizamos o CO₂, com o objetivo de impedir as rainhas virgens de tomarem decisões, uma vez que essa substância possui efeito anestésico. Assumimos que as rainhas mantiveram sua atratividade, mesmo após a aplicação de CO₂, assim como no estudo de Jarau et al. (2009), no qual provocou uma “morte experimental” em rainhas virgens, através do seu congelamento.

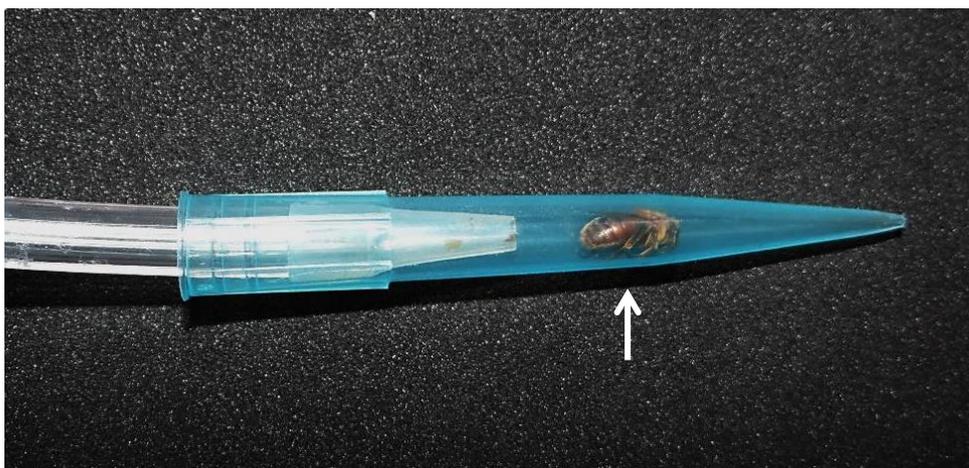


Figura 1 – Rainha virgem de *Melipona flavolineata*, indicada pela seta, sendo induzida à narcose através da exposição ao fluxo de CO₂, que passa através do tubo transparente sem cor. A rainha encontra-se dentro do tubo transparente azul, que contém um pequeno orifício na extremidade mais fina, por onde flui a corrente de CO₂. Foto: Jamille Veiga.

O teste consistiu na apresentação individual das rainhas virgens a dez machos maduros diferentes, em arena de cópula confinada (Figura 2). A mesma rainha foi apresentada nas duas situações, em condições normais (antes da aplicação de CO₂) e inerte (depois da aplicação de CO₂), resultando, portanto, em amostras dependentes. Ao total, foram realizados 30 testes, dois para cada rainha virgem, totalizando 15 observações pareadas. Nenhum dos machos foi reutilizado nos testes subsequentes.

Cada teste teve duração total de três minutos, durante os quais contabilizamos o número de tentativas de acasalamento com eversões, por parte dos machos (número de perdas da genitália masculina), e o número de acasalamentos efetivos (número de machos que introduziram a sua genitália na fêmea). A arena de cópula utilizada consistiu numa caixa de madeira (dimensões: 12 cm x 12 cm x 6 cm), coberta por uma lâmina de vidro, assim permitindo a visualização do seu interior. Após os testes, as rainhas virgens foram acondicionadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo

12 operárias (ainda incapazes de voar) e alimento *ad libitum* (pólen fermentado e mel de *Apis mellifera*).

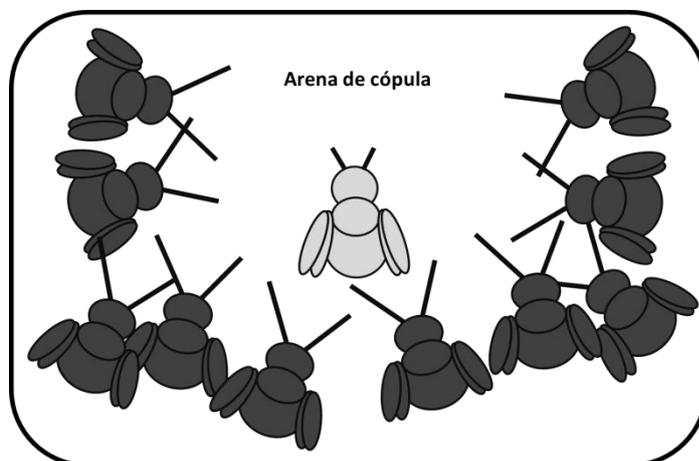


Figura 2 – Representação do teste de acasalamento na espécie *Melipona flavolineata*, utilizando dez machos sexualmente maduros, e uma rainha virgem, em arena de cópula confinada.

Acasalamentos em diferentes ambientes

Nesse experimento, nosso objetivo foi testar a realização de acasalamentos controlados em dois tipos de ambientes. Para tanto, as rainhas foram mantidas em condições variadas, confinadas em laboratório, com acesso ilimitado a pólen e mel. As rainhas virgens tiveram suas asas cortadas à metade, no intuito de impedir seu voo durante os procedimentos.

Os testes consistiram na apresentação individual das rainhas a machos sexualmente maduros, em duas situações: a) arena de cópula confinada; b) em campo, próximo a agregações reprodutivas. A mesma rainha foi apresentada nas duas situações, resultando, mais uma vez, em amostras dependentes. Ao todo, foram realizados 48 testes, sendo dois para cada rainha virgem, totalizando 24 observações pareadas. Cada teste teve duração total de três minutos, durante os quais contabilizamos o número de tentativas de acasalamento com eversões (número de

perdas da genitália masculina), e o número de acasalamentos efetivos (número de machos que introduziram a sua genitália na fêmea).

Em arena confinada (descrita anteriormente), cada teste foi conduzido utilizando-se dez machos (Figura 2). Em campo, por sua vez, as rainhas eram liberadas no chão, em uma lona estendida sobre a grama, a 1 metro de distância de um agregado reprodutivo (Figura 3). Nessa condição, foi possível controlar o número de machos disponíveis (estimamos a presença de aproximadamente 100 indivíduos no agregado utilizado).

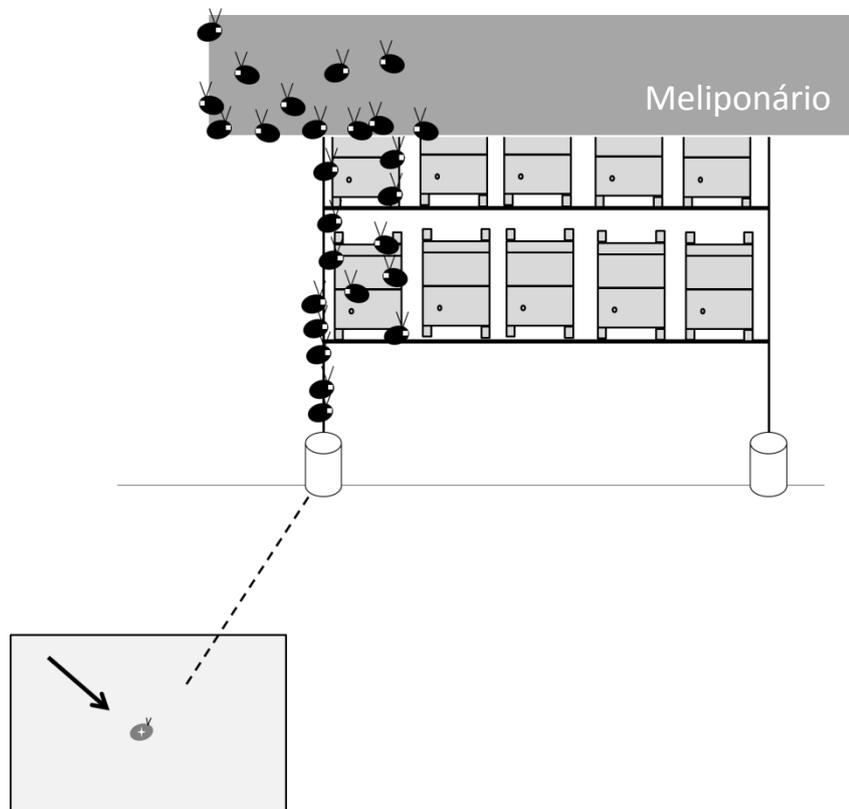


Figura 3 – Representação do teste de acasalamento de *Melipona flavolineata* realizado em campo, próximo a uma agregação reprodutiva. A seta indica uma rainha virgem sendo ofertada, a aproximadamente a um metro de distância (linha tracejada) do agregado de machos (indivíduos aglomerados no Meliponário), sobre uma lona estendida no solo.

Análises dos dados

Para testar se houve diferença na resposta dos machos (número de eversões) em diferentes condições de acasalamentos controlados, foi utilizado o teste t pareado. Para testar se houve diferença na resposta das rainhas virgens (número de cópulas efetivas) em diferentes condições de acasalamentos controlados, foi utilizado o teste Qui-quadrado pareado (teste de McNemar). Em ambos os testes consideramos um nível de significância de 5% (Siegel & Castellan Jr., 2006)

Para testar se houve diferença na resposta dos machos (número de tentativas com eversão da genitália) em diferentes condições de acasalamentos controlados, foi utilizado o teste t pareado (Siegel & Castellan Jr., 2006). Para testar se as rainhas controlam a cópula (número de acasalamentos efetivos) em diferentes condições de acasalamentos controlados, foi utilizado o teste qui-quadrado pareado (teste de McNemar) (Siegel & Castellan Jr., 2006). O nível de significância utilizado em ambos os testes foi de 5% (Siegel & Castellan Jr., 2006).

Resultados

Comportamentos observados durante os testes de acasalamento

Durante a realização dos testes, pudemos observar peculiaridades nos comportamentos de machos e rainhas virgens associados à cópula, nas diferentes situações testadas. Exclusivos dos testes em confinamento foram os seguintes comportamentos: solicitação e realização de trofaláxis das rainhas virgens com os machos. Já para os testes em campo, registramos que uma espécie de “voo de patrulha” em zigue-zague, desempenhado pelos machos, em busca das rainhas que estavam no solo (para visualizar o comportamento, acesse: <http://migre.me/oPhGF>), foi o único comportamento exclusivo. Em ambas as situações, confinamento e campo, observamos comportamentos compartilhados, sendo eles, a distensão abdominal das rainhas, com frequente fricção das pernas nas laterais do abdome, e a imobilização da rainha virgem, com o macho pressionando suas pernas e englobando o abdome da mesma.

Observamos também outros dois comportamentos compartilhados entre os ambientes. O primeiro deles foi o fechamento das placas genitais, por parte das rainhas, enquanto os machos tentavam copular com elas. Esse comportamento sempre precedia o segundo comportamento inesperado, a perda do endófalco por parte dos machos (Figura 4a; para visualizar os comportamentos, acesse: <http://migre.me/oPhJL>). Ao evertarem suas cápsulas genitais, e incapazes de inseri-las com sucesso nas rainhas virgens, os machos perdiam definitivamente seu órgão copulador (Figura 4c). Apenas em campo, observamos um macho de outra espécie, *M. melanoventer*, sendo atraído por uma rainha de *M. flavolineata*, e evertendo sua genitália, sem conseguir inseri-la na rainha virgem.

No experimento com rainhas narcotizadas, constatamos que muitas vezes os machos tentavam acasalar com as rainhas numa posição não usual. Quando apresentávamos as fêmeas “adormecidas”, elas permaneciam inertes no chão da arena, como se estivessem “deitadas de lado”. Assim, quando o macho tentava montá-la, acabava arrastando-a pela arena (Figura 4b; para visualizar os comportamentos, acesse: <http://migre.me/oPhKP>).



Figura 4 – a) Tentativas de cópula em *Melipona flavolineata*, com eversão da genitália masculina; b) Cópula efetiva, na qual o macho introduziu com sucesso o seu endófalo na rainha virgem narcotizada c) Macho com endófalo evertido; d) Rainha virgem inerte após exposição ao CO₂. Fotos: Cristiano Menezes.

Acasalamentos com rainhas virgens em condições normais e inertes

Ao apresentarmos rainhas virgens em diferentes condições, normais ou narcotizadas, observamos que houve diferença na resposta dos machos em relação ao estado das rainhas ($t_{\text{dependente}} = 3,742$; GL = 14; $p = 0,002$). Em média, um zangão a menos foi estimulado após a narcose das rainhas virgens. Observamos também que houve diferença na ocorrência de cópulas efetivas ($\chi^2_{\text{pareado}} = 8,100$; GL = 1; $p = 0,004$), as quais não ocorreram em 100% ($n = 15$) dos testes com rainhas em condições normais, mas se efetivaram em 66,66% ($n = 10$) dos testes com rainhas “adormecidas” (Tabela 1).

Em até três dias após os procedimentos de acasalamento, e subsequente acondicionamento das rainhas em placas de Petri, nove rainhas morreram. Portanto, procedemos à dissecação das espermatecas para verificar se as mesmas estavam repletas de sêmen. Constatamos que, dessas nove rainhas, cinco foram inseminadas com sucesso. Dentre as acasaladas, tivemos uma que sobreviveu aos procedimentos, desenvolveu fisogastria e fundou uma colônia independente.

Tabela 1 – Número de tentativas (eversões dos machos) e cópulas bem sucedidas com rainhas virgens de *Melipona flavolineata* em condições normais ou inertes (narcotizadas pelo uso de CO₂).

Rainha #	Rainhas em condições normais (Antes do CO ₂)		Rainhas narcotizadas (Depois do CO ₂)	
	Eversões	Cópulas efetivas	Eversões	Cópulas efetivas
1	4	0	1	0
2	1	0	0	1
3	0	0	0	0
4	4	0	0	1
5	3	0	0	1
6	2	0	0	1
7	2	0	0	1
8	3	0	0	1
9	5	0	1	1
10	9	0	0	1
11	3	0	0	1
12	1	0	0	0
13	2	0	0	0
14	0	0	0	1
15	3	0	0	0

Acasalamentos em diferentes ambientes

Observamos que houve diferença na resposta dos machos (número de eversões) quando apresentamos rainhas virgens em campo e em confinamento ($t_{\text{dependente}} = -2,289$; GL = 23; $p = 0,032$). Em média, dois machos a mais foram atraídos quando as rainhas foram apresentadas em campo, próximo a agregações reprodutivas. Constatamos ainda que, não houve diferença na frequência de acasalamentos entre os dois ambientes ($\chi^2_{\text{pareado}} = 0,500$; GL = 1; $p = 0,479$). Em confinamento, não ocorreram cópulas em 100% ($n = 24$) dos eventos, já em campo, houve cópulas em 8,33% ($n = 2$) deles (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de tentativas (eversões dos machos) e cópulas bem sucedidas com rainhas virgens de *Melipona flavolineata* em arenas de cópula e no agregado reprodutivo.

Rainha #	Arena de cópula (confinamento)		Agregado reprodutivo (em campo)	
	Eversões	Cópulas efetivas	Eversões	Cópulas efetivas
1	2	0	19	0
2	1	0	8	0
3	0	0	0	0
4	0	0	5	0
5	1	0	5	0
6	0	0	10	0
7	0	0	0	0
8	1	0	0	0
9	0	0	3	1
10	1	0	6	0
11	2	0	2	0
12	1	0	3	0
13	3	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	1	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	2	0
19	3	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	4	0	1	0
24	0	0	9	1

Discussão

Em *M. flavolineata* registramos comportamentos associados ao acasalamento que se mostraram inesperados e que ainda não haviam sido reportados para o gênero *Melipona*. As rainhas virgens impediram a ocorrência de acasalamentos ao fechar ativamente suas placas genitais. A maioria dos machos, na tentativa de copular, liberou o endófalo, sem conseguir inseri-lo nas rainhas virgens. O fechamento das placas e a eversão do endófalo foram comportamentos muito específicos, que se repetiram em diferentes condições, sugerindo que existe um controle das rainhas sobre o momento ou as condições adequadas para realizar a cópula. Em condições de confinamento, esses comportamentos também foram observados em *Scaptotrigona* aff. *depilis*, com algumas rainhas desviando ativamente a ponta do seu abdome, em resposta aos machos que nelas montavam (Menezes, 2010). O comportamento de eversão do endófalo sem penetração na rainha virgem também foi registrado nessa espécie (Menezes, 2010).

O único contexto em que não houve controle da cópula por parte das rainhas foi quando estavam narcotizadas, ou seja, impedidas de fechar as placas genitais, optando por não acasalar. Esse foi o único contexto em que foi possível, aos machos de *M. flavolineata*, introduzir o endófalo com sucesso nas rainhas virgens. Entretanto, atestamos que o sucesso dos acasalamentos controlados foi baixo. Mesmo que a proporção de acasalamentos efetivos tenha sido de 66,66% (n = 10) no experimento com rainhas narcotizadas, a sobrevivência de rainhas acasaladas foi igual a 1% (n = 1).

Demonstramos ainda que, tanto nos testes realizados em campo como em confinamento (com rainhas em condições normais), as fêmeas escolheram não acasalar, mantendo suas placas genitais fortemente fechadas e resistindo às investidas dos machos. Embora o número de machos que tentou copular com as rainhas tenha sido maior em campo, a proporção de acasalamentos efetivos foi ainda menor do que no experimento com rainhas narcotizadas, caindo de 66,66% para 8,33% dos eventos.

Nossos resultados são contrastantes com os de Camargo (1976), que obteve 29 acasalamentos efetivos com *M. quadrifasciata* em condições controladas (dois quais 12 rainhas realizaram postura e fundaram colônias). O método utilizado pela autora consistiu na simples apresentação individual das rainhas virgens, também mantidas em

pequenas colônias, a machos sexualmente maduros em arenas de cópula. Tal procedimento foi repetido com sucesso em outros estudos que, utilizando a mesma espécie, também obtiveram acasalamentos efetivos (Bezerra, 1995; Melo et al., 2001). Contudo, nenhum desses estudos registrou a eversão do endófalco dos machos em consequência do fechamento das placas genitais de rainhas atrativas. Considerando que esses comportamentos são bastante específicos (o fechamento das placas e a eversão do endófalco), e possíveis indicadores de uma forte seleção de parceiros, ou das condições adequadas para a ocorrência de cópulas, acreditamos que os acasalamentos sejam rigidamente controlados em *M. flavolineata*. Sendo assim, a que se deve esse controle tão intenso?

Os machos férteis dos meliponíneos se originam de ovos não fecundados (ou haploides), enquanto as fêmeas, rainhas virgens ou operárias, se originam de ovos fecundados (ou diploides) (Wilson, 1971; Heimpel & de Boer, 2008). Nos meliponíneos, adicionalmente ao sistema haplo-diploide de determinação do sexo dos himenópteros, existe outro sistema que contribui na determinação sexual, o sistema complementar de determinação do sexo com locus único (*single-locus complementary sex determination*, em inglês; Cook & Crozier, 1995). Devido a esse sistema, existe a possibilidade genética de surgir um novo tipo de indivíduo, o diploide homocigoto (para locus sexual), que dará origem a machos inférteis e menos longevos, os machos diploides (Camargo, 1979; 1982). Essa possibilidade se torna real quando ocorrem endocruzamentos, ou seja, acasalamentos entre indivíduos que compartilhem o mesmo alelo no locus sexual, sendo a combinação mais alarmante entre irmãos (Cook & Crozier, 1995; Zayed & Packer, 2005; Hedrick et al., 2006). Como consequência, uma população que seria completamente dominada por fêmeas, se torna composta por 50% de machos diploides.

A presença de machos diploides em uma colônia não é desejada, uma vez que estes não contribuem com a força de trabalho (por serem machos), tão pouco com a reprodução, por terem longevidade reduzida e sua prole não ser viável (Camargo, 1982; Cook & Crozier, 1995). Ao invés de valiosos, como são os machos haploides, os diploides representam um custo para a colônia. O endocruzamento, portanto, é um grave problema para as populações de abelhas sem ferrão. A produção desses machos

resulta em elevadas taxas de substituição de rainhas (Alves et al., 2011), um mecanismo das operárias para reverter a situação.

Porém, existem mecanismos de evitar que os endocruzamentos aconteçam nas populações naturais. Um deles é promover a dispersão dos machos dos seus locais de origem (observado em *M. favosa*, Sommeijer & Bruijn, 1995; em *S. mexicana*, Mueller et al., 2012; e em *T. angustula*, Santos, 2012). Nossos resultados sugerem estratégia complementar, que seria o intenso controle da cópula pelas rainhas virgens. Em condições artificiais, registramos que as rainhas oferecem resistência ao acasalamento, fechando ativamente suas placas genitais e, mesmo assim, provocam eversões da genitália dos machos. Uma hipótese que poderia explicar esses comportamentos seria que tais rainhas estão tentando evitar cópulas com indivíduos geneticamente relacionados e, ainda, conseguem eliminá-los da população de “machos disponíveis”, penalizando-os com a perda da sua única chance de acasalar.

O acasalamento com um irmão pode acontecer em dois contextos, o primeiro seria fora dos ninhos, em agregados reprodutivos compostos por machos de ninhos próximos. Esse cenário depende da densidade de colônias no local, bem como do nível de isolamento genético da população (Alves et al., 2011; Taft & Roff, 2012). Quanto menor a diversidade da população, maiores são as chances de uma rainha virgem acasalar com um macho irmão. Por outro lado, devido às baixas taxas de enxameação em meliponíneos (Roubik, 2006; Oliveira et al., 2013), e ao curto raio de dispersão de seus enxames (Nogueira-Neto, 1954; Sakagami, 1982; Roubik, 2006), é de se esperar que o endocruzamento seja uma ameaça real às populações naturais dessas abelhas. Contudo, nesse contexto dificilmente uma rainha virgem conseguiria distinguir um macho irmão de outro macho. Mais provável é que ela utilize a capacidade de escolha para decidir, dentre os machos disponíveis, aquele que tenha melhores aptidões (*e. g.* capacidade de voo, força para dominá-la, dentre outros).

O segundo contexto seria dentro dos ninhos. Embora nunca tenha sido comprovada em meliponíneos, a ocorrência de acasalamentos entre irmãos dentro das colmeias (em condições naturais), como ocorre em pelo menos seis espécies de *Bombus* (Krüger, 1951; Foster, 1992; Darvill et al., 2007), a possibilidade existe. Como demonstramos, os machos das abelhas sem ferrão se tornam sexualmente maduros e permanecem por algum tempo dentro dos ninhos (Capítulo 1; Van Veen et al., 1997). A

permanência desses machos no mesmo ambiente em que as rainhas virgens se tornam sexualmente atrativas e receptivas (Capítulo 2; Jarau et al., 2009; Kärcher et al., 2013), são eventos que podem favorecer a ocorrência de endocruzamentos dentro dos ninhos. Isso reforça, mais uma vez, que a habilidade das rainhas virgens em fechar as placas genitais pode ser interpretada como um mecanismo para evitar acasalamentos com irmãos. Para identificá-los, as rainhas podem ser guiadas através de pistas químicas, como fazem as vespas escavadoras (Herzner et al., 2006), ou as abelhas primitivamente eussociais do gênero *Bombus* (Foster, 1992); especialmente através dos perfis de hidrocarbonetos da cutícula, os quais costumam apresentar uma porcentagem compartilhada entre indivíduos relacionados (Nunes & Turatti, 2009; Pianaro et al., 2009; Ferreira-Caliman et al., 2013). Se elas realmente fazem essa identificação e usam-na como motivo para decidir acasalar ou não, é uma hipótese que ainda precisa ser testada em meliponíneos.

Destacamos, contudo, que o baixo número de acasalamentos em campo pode não ter relação com um mecanismo para evitar endocruzamentos, e sim com uma falha natural na proporção de fêmeas que irão acasalar de fato em uma dada população (Rhainds, 2010). Em condições experimentais, Camargo (1976) observou que em *M. quadrifasciata*, 35% das rainhas virgens nunca copulam. Devido à diversidade de espécies em Meliponini, é possível que essa margem de falhas de cópula também seja variável, mesmo dentro de um único gênero.

Respostas dos machos em diferentes condições de acasalamento

Demonstramos que ocorrem modificações nas respostas dos grupos de machos quando estes são expostos a rainhas virgens que se encontram em diferentes condições fisiológicas (normais ou inertes), ou quando expostos em diferentes ambientes. No primeiro caso, “menos indivíduos” foram atraídos por rainhas narcotizadas, porque aqueles que tentaram acasalar, logo nas primeiras tentativas, conseguiram. No segundo, “mais indivíduos” foram atraídos por rainhas em campo, do que em confinamento, devido a quantidade de machos disponíveis no ambiente ser maior (em comparação às condições experimentais propostas nesse estudo).

É importante destacar que, em vários testes, algumas rainhas não atraíram machos em confinamento, mas o fizeram quando apresentadas em campo (Tabela 2). Isso indica que, ao levar certa quantidade de machos ao confinamento, pode-se estar selecionando indivíduos que talvez não respondam aos estímulos visuais e químicos das rainhas virgens atrativas (Engels et al., 1993; Imperatriz-Fonseca & Zucchi, 1995; Jarau et al., 2009; Fierro et al., 2011; Kärcher et al., 2013).

Esse raciocínio é reforçado pelo que aconteceu quando apresentamos as rainhas virgens próximas ao agregado reprodutivo, onde no máximo 19 machos, dentre aproximadamente 100 indivíduos, realizaram o “voo de patrulha” em busca das fêmeas ofertadas. Sugerindo, finalmente, que apenas uma porcentagem desses indivíduos é estimulada pela presença de determinada rainha virgem. Logo, ao levar os zangões para o confinamento, corre-se o risco de selecionar indivíduos que nunca seriam estimulados por aquela rainha virgem, mesmo em condições naturais, excluindo aqueles que demonstrariam interesse (Sommeijer et al., 2004). Uma solução para esse problema é se utilizar de grande número de machos, como feito por Engels & Engels (1988), também em testes de confinamento.

Observamos ainda que um macho de outra espécie, *M. melanoventer*, foi atraído por uma de nossas rainhas virgens (*M. flavolineata*), realizando o mesmo comportamento observado em machos anteriores: evertu sua genitália, sem conseguir inseri-la na rainha virgem. A presença de outras espécies num agregado de machos de determinada espécie tem sido observada nos meliponíneos (Santos et al. 2014; observação pessoal). Mas uma rainha virgem atraindo um macho de espécie diferente da sua é um acontecimento nunca registrado. Essa observação é, no mínimo, interessante, e reforça a possibilidade de ocorrência de hibridização entre espécies dentro de *Melipona* (registrado entre *M. scutellaris* e *M. capixaba*; Nascimento et al., 2000).

Referências

- ALVES, D.A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., FRANCOY, T.M., SANTOS-FILHO, P.S., BILLEN, J. & WENSELEERS, T. (2011) Successful maintenance of a stingless bee population despite a severe genetic bottleneck. *Conservation Genetics*, 12, 647–658.
- BEZERRA, J.M.D. (1995) Aspectos da reprodução de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Mestrado/Doutorado.
- CAMARGO, C.A. (1972) Mating of the social bee *Melipona quadrifasciata* under controlled conditions (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 45, 520–523.
- CAMARGO, C.A. (1976) Determinação do sexo e controle da reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Universidade de São Paulo.
- CAMARGO, C.A. (1979) Sex determination in bees. XI Production of diploid males and sex determination in *Melipona quadrifasciata*. *Journal of Apicultural Research*, 18, 77–84.
- CAMARGO, C.A. (1982) Longevity of Diploid Males, Haploid Males, and Workers of the Social Bee *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 55, 3–12.
- CAMPOS, L.A.O. & MELO, G.A.R. (1990) Physogastric-queen mating in *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Genética*, 13, 491–500.
- COOK, J.M. & CROZIER, R.H. (1995) Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 281–286.
- COTTON, S., SMALL, J. & POMIANKOWSKI, A. (2006) Sexual selection and condition-dependent mate preferences. *Current Biology*, 16, 755–765.
- DARVILL, B., LYE, G. & GOULSON, D. (2007) Aggregations of male *Bombus muscorum* (Hymenoptera: Apidae) at mature nests. Incestuous brothers or amorous suitors? *Apidologie*, 38, 518–524.
- EBERHARD, W. (1996) Female control: sexual selection by cryptic female choice. p. 492. PRINCETON UNIVERSITY PRESS, NEW JERSEY.
- ENGELS, E. & ENGELS, W. (1988) Age-dependent queen attractiveness for drones and mating in the stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Journal of Apicultural Research*, 27, 3–8.

- ENGELS, E., ENGELS, W., LÜBKE, G., SCHRÖDER, W. & FRANCKE, W. (1993) Age-related patterns of volatile cephalic constituents in queens of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* Latr (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 24, 539–548.
- ENGELS, W. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (1990) Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In *Social Insects* pp. 167–230. Springer Berlin Heidelberg.
- FERREIRA, N.T., BLOCHTEIN, B. & SERRÃO, J.E. (2013) Seasonal production and spatial distribution of *Melipona bicolor schencki* (Apidae; Meliponini) castes in brood combs in southern Brazil. *Apidologie*, 44, 176–187.
- FERREIRA-CALIMAN, M.J., FALCÓN, T., MATEUS, S., ZUCCHI, R. & NASCIMENTO, F.S. (2013) Chemical identity of recently emerged workers, males, and queens in the stingless bee *Melipona marginata*. *Apidologie*, 44, 657–665.
- FIERRO, M.M., CRUZ-LÓPEZ, L., SÁNCHEZ, D., VILLANUEVA-GUTIÉRREZ, R. & VANDAME, R. (2011) Queen volatiles as a modulator of *Tetragonisca angustula* drone behavior. *Journal of Chemical Ecology*, 37, 1255–1262.
- FOSTER, R.L. (1992) Nestmate recognition as an inbreeding avoidance mechanism in bumble bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 238–243.
- HEDRICK, P.W., GADAU, J. & PAGE, R.E. (2006) Genetic sex determination and extinction. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 55–57.
- HEIMPEL, G.E. & DE BOER, J.G. (2008) Sex determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 53, 209–230.
- HERZNER, G., SCHMITT, T., HECKEL, F., SCHREIER, P. & STROHM, E. (2006) Brothers smell similar: Variation in the sex pheromone of male European Beewolves *Philanthus triangulum* F. (Hymenoptera: Crabronidae) and its implications for inbreeding avoidance. *Biological Journal of the Linnean Society*, 89, 433–442.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., MATOS, E.T., FERREIRA, F. & VELTHUIS, H.H.W. (1998) A case of multiple mating in stingless bees (Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 45, 231–233.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & ZUCCHI, R. (1995) Virgin queens in stingless bee (Apidae, Meliponinae) colonies: a review. *Apidologie*, 26, 231–244.
- JAFFÉ, R., PIOKER-HARA, F.C., SANTOS, C.F. DOS, SANTIAGO, L.R., ALVES, D. A., DE KLEINERT, A.M.P., ET AL. (2014) Monogamy in large bee societies: a stingless paradox. *Die Naturwissenschaften*, 101, 261–264.
- JARAU, S., VAN VEEN, J.W., AGUILAR, I. & AYASSE, M. (2009) Virgin queen execution in the stingless bee *Melipona beecheii*: The sign stimulus for worker attacks. *Apidologie*, 40, 496–507.

- JOHNSTONE, R.A., REYNOLDS, J.D. & DEUTSCH, J.C. (1996) Mutual mate choice and sex differences in choosiness. *Evolution*, 50, 1382–1391.
- KÄRCHER, M.H., MENEZES, C., ALVES, D.A., BEVERIDGE, O.S., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & RATNIEKS, F.L.W. (2013) Factors influencing survival duration and choice of virgin queens in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Die Naturwissenschaften*, 100, 571–580.
- KEMPENAERS, B. (2007) Mate Choice and Genetic Quality: A Review of the Heterozygosity Theory. *Advances in the Study of Behavior*, 37, 189–278.
- KERR, W.E., ZUCCHI, R., NAKADAIRA, J.T. & BUTOLO, J.E. (1962) Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*, 70, 265–276.
- KOEDAM, D., AGUILAR MONGE, I. & SOMMEIJER, M.J. (1995) Social interactions of gynes and their longevity in queenright colonies of *Melipona favosa* (Apidae: Meliponinae). *Netherlands Journal of Zoology*, 45, 480–494. *Netherlands Journal of Zoology*.
- KRÜGER, E. (1951) Über die Balinfiüge der Männchen der Gattungen *Bombus* und *Psithyrus* (Bombidae Hymenopt.). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 8, 61–75.
- LÜPOLD, S., TOMKINS, J.L., SIMMONS, L.W. & FITZPATRICK, J.L. (2014) Female monopolization mediates the relationship between pre- and postcopulatory sexual traits. *Nature Communications*, 5, 3184.
- MELO, G.A.R., BUSCHINI, M.L.T. & CAMPOS, L.A.O. (2001) Ovarian activation in *Melipona quadrifasciata* queens triggered by mating plug stimulation (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 32, 355–361.
- MENEZES, C. (2010) A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona aff. depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Universidade de São Paulo. Tesde de Doutorado.
- MICHENER, C. D. (2007) The bees of the world. In p. 953, 2nd edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- MICHENER, C. D. (2013) The Meliponini. In *Pot-Honey: A legacy of the stingless bees* pp. 3–17. Springer Science & Business Media, New York.
- MICHENER, C.D. (1990) Classification of the Apidae (Hymenoptera). *University of Kansas Science Bulletin*, 54, 75–164.
- MUELLER, M.Y., MORITZ, R.F. & KRAUS, F.B. (2012) Outbreeding and lack of temporal genetic structure in a drone congregation of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. *Ecology and Evolution*, 2, 1304–1311.

- NASCIMENTO, V.A., MATUSITA, S.H. & KERR, W.E. (2000) Evidence of hybridization between two species of *Melipona* bees. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 79–81.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1953) Criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae).
- NOGUEIRA-NETO, P. (1954) Notas bionômicas sobre meliponíneos: III—Sobre a enxameagem. *Arq. Mus. Nac.*
- NOGUEIRA-NETO, P. (1997) Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. In p. 447. Nogueirapis, São Paulo.
- NUNES, T.M., TURATTI, I. C. C., LOPES, N. P. & ZUCCHI, R. (2009) Chemical signals in the stingless bee, *Frieseomelitta varia*, indicate caste, gender, age, and reproductive status. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 1172–1180.
- OLIVEIRA, R.C., MENEZES, C., SOARES, A.E.E. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2013) Trap-nests for stingless bees (Hymenoptera, Meliponini). *Apidologie*, 44, 29–37.
- PEDRO, S.R.M. (2014) The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera : Apidae). *Sociobiology*, 61, 348–354.
- PEEL, M.C., FINLAYSON, B.L. & MCMAHON, T.A. (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, 4, 439–473.
- PIANARO, A., MENEZES, C., KERR, W.E., SINGER, R.B., PATRICIO, E.F.L.R.A. & MARSAIOLI, A.J. (2009) Stingless bees: Chemical differences and potential functions in *Nannotrigona testaceicornis* and *Plebeia droryana* males and workers. *Journal of Chemical Ecology*.
- RHAINDS, M. (2010) Female mating failures in insects. *The Netherlands Entomological Society*, 136, 211–226.
- ROUBIK, D.W. (2006) Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37, 124–143.
- SAKAGAMI, S. (1982) Stingless Bees. *Social Insects*, v. 3 pp. 361–423.
- SANTOS, C.F. (2012) Biologia reprodutiva das rainhas e machos de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Meliponini). Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado.
- SANTOS, C.F., MENEZES, C., VOLLET-NETO, A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (2014) Congregation sites and sleeping roost of male stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*, 61, 115–118.
- SANTOS-FILHO, P.S., ALVES, D. A., ETEROVIC, A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. & KLEINERT, A. M.P. (2006) Numerical investment in sex and caste by stingless bees (Apidae: Meliponini): a comparative analysis. *Apidologie*, 37, 207–221.

- SIEGEL, S. & CASTELLAN JR., N.J. (2006) Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. In p. 4482^a ed. Artmed, Porto Alegre.
- SILVA, D.N. DA, ZUCCHI, R. & KERR, W. E. (1972) Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Animal Behaviour*, 20, 123–132.
- SILVEIRA, F.A., MELO, G.A.R. & ALMEIDA, E.A.B. (2002) Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. In p. 253, 1^a edition. Ministério do Meio Ambiente e Fundação Araucária, Belo Horizonte, MG.
- SOMMEIJER, M., BRUIJN, L. DE & MEEUWSEN, F. (2004) Behaviour of males, gynes and workers at drone congregation sites of the stingless bee *Melipona favosa* (Apidae: Meliponini). *Entomologische Berichten*, 64, 10–15.
- SOMMEIJER, M.J. & BRUIJN, L.L.M. DE (1995) Drone congregations apart from the nest in *Melipona favosa*. *Insectes Sociaux*, 42, 123–127.
- STRASSMANN, J. (2001) The rarity of multiple mating by females in the social Hymenoptera. *Insectes Sociaux*, 48, 1–13.
- TAFT, H.R. & ROFF, D. A. (2012) Do bottlenecks increase additive genetic variance? *Conservation Genetics*, 13, 333–342.
- THORNHILL, R. & ALCOCK, J. (1983) The evolution of insect mating systems.
- VAN VEEN, J.W., SOMMEIJER, M.J. & MEEUWSEN, F. (1997) Behaviour of drones in *Melipona* (Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux*, 44, 435–447.
- VENTURIERI, G.C., ALVES, D.A., VILLAS-BÔAS, J.K., CARVALHO, C.A.L. DE, MENEZES, C., VOLLET-NETO, A., ET AL. (2012) Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In *Polinizadores no Brasil: Contribuição e Perspectivas para a Biodiversidade, Uso Sustentável, Conservação e Serviços Ambientais* (eds V.L. Imperatriz-Fonseca, D.A.L. Canhos, D. de A. Alves & A.M. Saraiva), p. 488, 1^a edition. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- VAN WILGENBURG, E., DRIESSEN, G. & BEUKEBOOM, L.W. (2006) Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an 'unintelligent' design? *Frontiers in Zoology*, 3, 1–15.
- WILSON, E.O. (1971) The Insect Societies. *Harvard, Mass* p. 548. Harvard University Press, Cambridge.
- ZAYED, A. & PACKER, L. (2005) Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10742–10746.

Discussão geral e considerações finais

O ciclo de vida dos sexuais (machos e rainhas virgens) da abelha sem ferrão *Melipona flavolineata* tem início quando estes ainda se encontram dentro do ninho. Ao longo da vida adulta, os machos desenvolvem a maturidade sexual e a habilidade de voo, as quais se estabilizam entre 10 e 15 dias de idade (**Capítulo 1**). Da mesma forma, as rainhas virgens desenvolvem atratividade e receptividade sexual, a qual se manifesta antecipadamente no início da fase adulta e mantém-se constante ao longo dela, podendo sofrer alterações devido ao contexto social em que as rainhas estão inseridas (**Capítulo 2**).

Os machos se tornam reprodutivamente aptos e permanecem por algum tempo dentro dos ninhos (**Capítulo 1**). A permanência desses machos no mesmo ambiente em que as rainhas virgens desenvolvem sua aptidão reprodutiva (**Capítulo 2**) são eventos que podem favorecer a ocorrência de endocruzamentos dentro dos ninhos. Demonstramos que as rainhas virgens de *M. flavolineata* tem a capacidade de fechar ativamente suas placas genitais e, assim provocar eversões nos machos, sem que estes consigam copular efetivamente com essas rainhas (**Capítulo 3**). Nesse contexto, interpretamos esse comportamento como um mecanismo que evoluiu para evitar acasalamentos com irmãos, embora a habilidade de uma rainha em identificar um macho geneticamente relacionado ainda precise ser demonstrada.

Nessa dissertação investigamos aspectos da biologia reprodutiva de meliponíneos, utilizando somente uma espécie como modelo para o estudo. Essa abordagem de espécie-alvo foi essencial por dois motivos: a) ainda existem poucos estudos sobre *M. flavolineata*, e nenhum deles versa sobre a sua biologia reprodutiva; b) focar numa espécie pouco estudada traz novas informações para as abelhas sem ferrão, em termos de diversidade, enriquecendo as comparações das histórias de vida e estratégias ecológicas e evolutivas entre as espécies da Tribo.

Destacamos ainda que, por *M. flavolineata* ser considerada uma espécie de abelha sem ferrão de importância comercial (Magalhães & Venturieri, 2010; Contrera

et al., 2011; Venturieri et al., 2012) as informações levantadas com o presente estudo podem incrementar, futuramente, as práticas de manejo nessa espécie. Tais práticas atualmente estão bem estabelecidas apenas para a produção de mel e a multiplicação de ninhos (Magalhães & Venturieri, 2010; Contrera et al., 2011), enquanto o manejo específico para a produção massal de colônias ainda esbarra em questões básicas, como o conhecimento da biologia reprodutiva. Agora, temos informações sobre como criar machos e rainhas virgens em laboratório (Capítulos 1 e 2) para serem utilizados em acasalamentos sob condições controladas (assim como temos para *M. quadrifasciata*; Camargo, 1972; 1976). E, sabendo que a indução de acasalamentos em condições artificiais tem baixo sucesso em *M. flavolineata* (como teve em *Apis mellifera*; Réaumur, 1740; Nowakowski & Morse, 1971) os esforços de pesquisa podem ser direcionados para outras técnicas de controle da reprodução, como os núcleos de fecundação e a inseminação artificial (Laidlaw, 1944; Woyke, 1962; Baer & Schmid-Hempel, 2000; Cobey et al., 2013).

O controle da reprodução de meliponíneos ainda é um gargalo a ser contornado para atingirmos com sucesso a produção de colônias em larga escala, com práticas de manejo bem estabelecidas (Cortopassi-Laurino et al., 2006; Contrera et al., 2011; Venturieri et al., 2012). Acreditamos que esse é um trabalho de prospecção de espécies, e que deve ser pensado em longo prazo.

Referências

- BAER, B. & SCHMID-HEMPEL, P. (2000) The artificial insemination of bumblebee queens. *Insectes Sociaux*, 47, 183–187.
- CAMARGO, C.A. (1972) Mating of the social bee *Melipona quadrifasciata* under controlled conditions (Hymenoptera, Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 45, 520–523.
- CAMARGO, C.A. (1976) Determinação do sexo e controle da reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae). Universidade de São Paulo.
- COBEY, S.W., TARPY, D.R. & WOYKE, J. (2013) Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1–18.
- CONTRERA, F.A.L., MENEZES, C. & VENTURIERI, G.C. (2011) New horizons on stingless beekeeping (Apidae, Meliponini). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 48–51.
- CORTOPASSI-LAURINO, M., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., ROUBIK, D.W., DOLLIN, A., HEARD, T., AGUILAR, I., ET AL. (2006) Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie*, 37, 275–292.
- LAIDLAW, H.H. (1944) Artificial insemination of the queen bee (*Apis mellifera* L.): morphological basis and results. *Journal of Morphology*, 74, 429–465.
- MAGALHÃES, T.L. DE & VENTURIERI, G.C. (2010) Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no Nordeste Paraense.
- NOWAKOWSKI, J. & MORSE, R.A. (1971) Attempts at mating queen honeybees in confinement. *Gleanings Bee Cult*, 99, 216–218.
- RÉAUMUR, R.A.F. DE (1740) Mémoires pour servir à l’histoire des insectes. p. 807. De l’Imprimerie Royale.
- VENTURIERI, G.C., ALVES, D.A., VILLAS-BÔAS, J.K., CARVALHO, C.A.L. DE, MENEZES, C., VOLLETNETO, A., ET AL. (2012) Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. In *Polinizadores no Brasil: Contribuição e Perspectivas para a Biodiversidade, Uso Sustentável, Conservação e Serviços Ambientais* (eds V.L. Imperatriz-fonseca, D.A.L. Canhos, D. de A. Alves & A.M. Saraiva), p. 488, 1ª edition. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- WOYKE, J. (1962) Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World*, 43, 21–25.