

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Melipona*
quadrifasciata anthidioides Lepeletier e *Tetragonisca angustula angustula*
Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**

DAVI SAID AIDAR

**Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto, USP, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.**

**Ribeirão Preto-SP
Brasil
1999**

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Melipona*
quadrifasciata anthidioides Lepeletier e *Tetragonisca angustula angustula*

Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)

DAVI SAID AIDAR

Orientador: Prof. Warwick Estevam Kerr

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP,
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

RIBEIRÃO PRETO
SÃO PAULO - BRASIL
Março - 1999

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que trabalham para a preservação das abelhas nativas e ecossistemas a elas relacionados.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Warwick E. Kerr, que esteve sempre presente e disposto a tudo para a realização deste trabalho.

À Dra. Eucleia P. B. Contel pela colaboração nos trabalhos das análises enzimáticas na população de *Melipona quadrifasciata*.

À Técnica Rubiane C. Pagotto, que sempre esteve ativa durante os experimentos, fornecendo apoio técnico sem limites.

À Dra. Zilá P.L. Simões que, na qualidade de Coordenadora do Curso de Pós Graduação em Entomologia da F.F.C.L.R.P., além de proporcionar todas as medidas administrativas para dar suporte aos experimentos, muitas vezes participou como conselheira.

Ao Dr. Carlos A. Garófalo, pelas orientações e apoio administrativo que esclareceram dúvidas importantes facilitando as atividades.

À Dra. Luci R. Bego, Dr. Espencer E. Soares, Dr. Paulo Nogueira-Neto que sempre esclareceram dúvidas e ofereceram apoio científico.

Ao Dr. Malcon A.M. Brandeburgo, Dr. Lucio A.O. Campos e Dr. Dejair Message que não mediram esforços para auxiliar no desfecho desta tese.

À Secretária Valdete A. S. Silva, pela sua eficiência e pontualidade. Auxiliou muito no setor administrativo e nos processos burocráticos do curso de Doutorado.

Ao Técnico José A. Tavares, sua irmã Rosana Tavares e ao Dr. Amilcar Tavares que cederam espaço em suas residências para abrigar parte das colmeias utilizadas nos experimentos aqui relatados e a todos que contribuíram para a execução desta tese de doutorado, inclusive minha família que suportou minha ausência nas atividades sociais para que houvesse mais dedicação na execução do curso e experimentos relativos à tese.

ÍNDICE

RESUMO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Meliponíneos e ecossistema	9
1.2. Considerações sobre as espécies estudadas	12
1.2.1. <i>Tetragonisca angustula angustula</i>	12
1.2.2. <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	14
1.3. Número de alelos sexuais xo nas populações das espécies estudadas	15
1.4. Polimorfismo enzimático em população de <i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	20
1.5. Alimentação artificial para meliponíneos	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Número de alelos xo na população de <i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	26
3.1.1. Seleção das colônias para cruzamento com populações do Espírito Santo	28
3.1.2. Distribuição das colônias nos meliponários do Espírito Santo	30
3.1.3. Colônias órfãs acasaladas no Espírito Santo e divisão no Meliponário-A	30
3.2. Número de alelos sexuais xo na população de <i>T. angustula angustula</i>	31
3.3. Polimorfismo enzimático na população de <i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	33
3.4. Manutenção das colônias experimentais	34
3.4.1. Alimentação proteica	34
3.4.2. Controle do principal predador: o forídeo (<i>Pseudohypocera</i> sp)	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Alelos sexuais xo na população de <i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i>	38
4.1.1. Diferenças entre colônias do Espírito Santo e do Meliponário-A	45
4.1.2. Tempo para as colônias órfãs iniciarem postura	46
4.2. Polimorfismo enzimático na população de <i>M. quadrifasciata anthidioides</i>	47
4.3. Alelos sexuais xo em população de <i>T. angustula angustula</i>	50
4.3.1. Estabilidade de população natural de <i>T. angustula angustula</i>	54
5. CONCLUSÕES	56
6. BIBLIOGRAFIA	58
APÊNDICE	70

RESUMO

A sobrevivência de colônias de meliponíneos é dependente da variabilidade genética da população de cada espécie e muitas espécies estão sendo extintas devido à consangüinidade e à diminuição de alelos x_0 , porque habitam pequenas áreas com poucas colônias. Quanto maior o número de colônias da mesma espécie na mesma área de reprodução, maior a oportunidade de sobrevivência. O estudo do número de alelos x_0 indica se a população está sob o efeito “Efeito Yokoyama e Nei” e assim, pode-se intervir, introduzindo novas rainhas ou colônias de outras regiões para aumentar o número de alelos x_0 e manter a população em equilíbrio, evitando mortes de colônias com a produção de machos diplóides.

Para medir a variabilidade genética das populações de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier e *Tetragonisca angustula angustula* Latraille, foram estudadas as populações do Meliponário-A, Rua José da Silva, 868, Ribeirão Preto, SP. Foi estimado o número de alelos sexuais x_0 nas duas populações usando o método desenvolvido por KERR (1987). Foram contadas as proporções de machos diplóides e fêmeas nos primeiros favos de crias originados das colônias filhas resultantes de divisões das colônias matrizes. As colônias filhas foram formadas com 2-3 favos nascentes e 100-150 abelhas de diferentes idades, de acordo com o Método 2 para multiplicação artificial de colônias de *M. q. anthidioides* em orfandade (AIDAR, 1996a). Com a mesma população dessa espécie foi estimado o número de alelos sexuais x_0 antes e depois da introdução de 10 colônias que tiveram suas rainhas acasaladas com machos de populações das regiões de Domingos Martins e São Paulo de Aracê, ES. O número de alelos sexuais antes e depois da introdução das colônias acasaladas no

Espírito Santo foi 8 (s=3,36) e 17,33 (s=9,23), respectivamente. O número de alelos sexuais na população de *T. a. angustula* foi 56 (s=54,03).

Com a mesma população de *M. q. anthidioides*, 8 operárias de cada uma das 52 colônias foram submetidas a análises eletroforéticas em gel de amido para investigar a variabilidade nos locos codificadores das enzimas EST, IDH, ME, PGM, SOD, α PGD, MDH, LAP, HK e PGI. As enzimas IDH, ME, PGM, SOD, α PGD, MDH e PGI não apresentaram variação. Para LAP e HK não foram detectadas atividades. No entanto, foi verificado polimorfismo para esterase em 51,92% das colônias. Pelo Teste χ^2 a heterogeneidade dessas populações demonstrou semelhança quanto às frequências alélicas desta enzima.

Para o desenvolvimento dos experimentos desta tese, as colônias de meliponíneos foram submetidas a técnicas de manejo específicas para populações de locais com poucas floradas. Aspectos de manejo, como alimentação artificial e manipulação para a manutenção das colônias em boas condições, também foram descritos.

ABSTRACTS

The survival of a population of stingless bees (Meliponinae) is dependent on the genetic variability of each species. Many species are becoming extinct due to inbreeding and to the constant diminution of xo sex alleles when the population inhabits an area that are of insufficient size, or that has a small number of colonies in same area of reproduction. Greater the number number of colonies in same area of reproduction greater will be their survival. The estimation of the number of xo heteroalleles indicates if the population is upon the "Yokoyama e Nei effect", that it is diminishing the number of xo sex alleles and the population may become extinct in a few generations. This can be reversed with re-introduction of queens or colonies of another region. In *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier the workers of a colony producing diploid males kill them and their queen.

In order to evaluate the genetic variability of populations of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier and *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, the populations of these bees maintained in the Meliponary-A, had the number of xo sex alleles estimated by using the method developed by KERR (1987). After a new queen begins egg layng, about 35 days later a brood comb is taken and a total of 30 bees, males and females, are counted. If this number is around one female to one male, this males were considered diploids. The colonies were divided by use of the method 2 of AIDAR (1996a). The number (n) of xo sex alleles of the population of *M. q. anthidioides* was n=8 (s=0,58) and it became 17,33 (s=1,25) after the introduction of 9 colonies from Domingos Martins, ES (900 km East of Ribeirão Preto, SP, where the Meliponariy-A is located).

The number of xo sex alleles on the population of *T. a. angustula* in the Meliponary-A was 56 (s=54,03).

Eight workers of *M. q. anthidioides* from each colony were collected from 52 hives and submitted to starch gel electrophoresis in order to investigate the genetic variation of the following enzymes: EST, IDH, ME, PGM, SOD, α PGD, MDH, LAP, HK and PGI enzymes. The enzymes LAP and HK did not show activity; EST showed two alleles and all the rest were monomorphic. The allele EST-S showed a frequency of 52,92%.

All the colonies were submitted to techniques used in dearth periods, like artificial feeding and fast handling.

1. INTRODUÇÃO

1.1. MELIPONÍNEOS E ECOSISTEMA

Uma população vegetal torna-se mais sensível às variações ambientais, principalmente epidemias, pragas e variações climáticas, com o desenvolvimento da uniformidade genética ocasionada pelos cruzamentos consangüíneos (HOYT, 1992), quer seja pela estrutura da flor ou pela coleta de um ou poucos exemplares da natureza para produção de sementes. Isso é aplicável também às populações animais.

O cruzamento entre plantas dióicas promove a manutenção da variabilidade genética e este sucesso reprodutivo depende em grande parte de insetos polinizadores (KERR, 1994a). As abelhas nativas são parte integrante deste mecanismo de reprodução vegetal, aumentando a produtividade das plantas cultivadas e a fertilidade dos vegetais que dependem da polinização cruzada para sobreviverem (GIMENES & MARQUES, 1996; MATEUS *et al.*, 1996; HOFFMANN & PEREIRA, 1996; CAMILLO, 1996). Especificamente sobre o papel dos meliponíneos na polinização, os trabalhos de KERR *et al.* (1995) e KERR (1997 e 1998) destacam a importância das abelhas nativas para a manutenção da diversidade vegetal nos trópicos. ABSY & KERR (1977) estudaram a *Melipona seminigra merrillae* em Manaus, AM, e mostraram as várias espécies vegetais visitadas por essa espécie. ABSY *et al.* (1980 e 1984) discutiram a associação inseto-planta, especificamente com meliponíneos e vegetais nativos na região de Manaus, AM. A extinção de espécies de abelhas nativas implica na possibilidade da extinção de espécies vegetais e desequilíbrio no ecossistema (KERR *et al.*, 1978 e 1994a; ROUBIK, 1989).

Com o aumento populacional da espécie humana, o incremento na produção de alimentos é um pré-requisito passivo de controvérsias. As variações no ambiente exigem das

plantas domesticadas, grande flexibilidade em seu genoma para suportarem esta heterogeneidade. A diversidade genética das populações vegetais locais e dos seus parentes silvestres representam recursos para a manutenção do vigor híbrido dos cultivares domesticados e utilizados em nossa alimentação e economia agrícola (HOYT, 1992). Para a manutenção da fauna e flora nativa é essencial não destruir as mais de trezentas espécies de abelhas sociais brasileiras.

BEGO *et al.* (1989) estudaram o comportamento de visita às flores por *Nannotrigona testaceicornis* em casa de vegetação e concluíram que esta espécie de abelha pode auxiliar na polinização de vegetais cultivados para alimentação humana.

O entendimento dos aspectos biológicos que compreendem os mecanismos de reprodução das abelhas nativas está associado a todos os esforços que estão sendo executados, nos últimos 50 anos, para a possível manutenção de algumas espécies geograficamente mais próximas do homem. As espécies ainda não classificadas e aquelas razoavelmente conhecidas estão sendo extintas com a destruição de seu habitat natural devido à acelerada ocupação irracional de novas áreas pela espécie humana (FALK, 1991; KERR, 1994, 1997 e 1998; KERR *et al.* 1994; AIDAR, 1997a, 1997b 1997c).

A organização da colônia dos insetos sociais, sua manutenção e o sucesso ecológico das várias espécies, relaciona-se aos mecanismos de reprodução desenvolvidos por estes insetos durante sua evolução (HAMILTON 1994; PAGE & METCALF, 1982). O comportamento geral do grupo ou da colônia de abelhas é influenciado pela maioria dos mecanismos das associações genotípicas características de cada espécie (PAGE *et al.*, 1983; HAMILTON, 1994; YOKOYAMA & NEI, 1979). O comportamento do grupo, por sua vez, é consequência dos mecanismos etológicos de reprodução que promovem maior hibridação e

capacidade de defesa contra várias doenças e variações ambientais (HAMILTON, 1994).

No Brasil são conhecidas mais de 300 espécies de abelhas nativas (*Meliponinae*) (KERR & MAULE, 1964), 7 espécies de mamangavas (*Bombinae*) (MOURE & SAKAGAMI, 1962), muitas de abelha-das-orquídeas ou mamangavinhas coloridas (*Euglossini*) e conservativamente, mais de 5.000 espécies de abelhas solitárias. A cada ano que passa, essas estimativas variam conforme as novas descobertas e pesquisas concluídas e os números talvez possam ser multiplicados por 10 (KERR, c.p.).

Com auxílio de um mapa SOARES (1994) relata a distribuição de locais com criações de abelhas nativas na América Latina e tribos indígenas que cultivam meliponíneos para uso dos seus subprodutos na alimentação. O autor também tem preocupação com a preservação das espécies que estão em processo de extinção, propondo estratégias para amenisar o problema.

A grande variação no tamanho dos indivíduos entre as espécies de abelhas proporciona eficiência na polinização e no ciclo reprodutivo dos vegetais tropicais (ROUBIK, 1989). Na Amazônia, 80% das árvores são bissexuais ou auto estéreis e dependem, em 90% dos casos, de abelhas para gerarem sementes férteis com a polinização (MICHENER, 1961, 1974 e 1979; ROUBIK, 1989; KERR *et al.*, 1994 e 1994b).

A maioria dos meliponíneos fundam seus ninhos em ocos, nos troncos de árvores (IHERING, 1932) e esta interação está associada à existência de árvores com diâmetro maior ou igual a 10cm, o que corresponde a 32% das árvores na região próxima a Manaus, AM (RIDRIGUES & VALLE, 1964; WALKER, 1991) e 27% nos campos e cerrados (KERR *et al.*, 1978 e 1994a).

As pesquisas aplicadas à genética, biologia e manejo de meliponíneos, estruturam

conhecimentos que permitirão a interferência do homem na manutenção ou multiplicação de colônias de abelhas nativas para tentar recuperar e manter os ecossistemas tropicais onde estão a maioria das matérias primas usadas pelo homem na medicina, indústria e alimentação em geral, assegurando a qualidade de vida da espécie humana.

1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS

1.2.1. *Tetragonisca angustula angustula*

Esta espécie, comumente chamada de jataí ou jati, é uma das mais comuns entre as espécies de meliponíneos. São conhecidas pelo menos duas subespécies: *Tetragonisca angustula angustula* Latreille e *Tetragonisca angustula fiebrigi* Schwarz. Apresentam distribuição neotropical e utilizam como substrato os mais variados locais para nidificação: cavidades em troncos de árvores, blocos de concreto ou de cerâmica, muros, alicerces, tubos de pvc e mesmo em cavidades subterrâneas superficiais. Isto promoveu sua adaptação inclusive ao ambiente das cidades, o que não ocorreu com a maioria das espécies de abelhas nativas que são exclusivas nidificadoras de ocos em troncos de árvores.

A facilidade com que a *T. a. angustula* tem para ocupar lugares variados para nidificação, adaptando-se às grandes cidades, influencia positivamente o sucesso evolutivo da espécie, mesmo com os grandes desmatamentos e as queimadas constantes nas florestas naturais do Brasil. KERR (c.p.) encontrou 80 ninhos em 96.000 m² na cidade de Ribeirão Preto, SP a 1 km do Meliponário-A.

É um dos meliponíneos encontrados em maior numero de países, distribuindo-se na região neotropical desde a Argentina até o México e ocorre em todo o território brasileiro (NOGUEIRA-NETO, 1970; ROUBIK, 1983 e 1989; CAMARGO & POSEY, 1990).

O mel de *T. a. angustula* é conhecido popularmente pelas suas propriedades terapêuticas e novos estudos vêm comprovando o seu efeito benéfico para a saúde humana (IWAMA & MELHEM, 1979; IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 1984). Foi comprovado que o mel de *T. a. angustula* apresenta ação bactericida quando foram realizados testes de difusão em agar com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BAZLEN, 1997).

Em centros urbanos, é grande a quantidade de colônias que podem ser encontradas, demonstrando ampla adaptação aos vários ecossistemas, mesmo sendo uma espécie com abelhas pequenas e com raio de ação em torno de 600 a 750 m (WILLE, 1983). Suas colônias podem conter até 1500 abelhas e algumas delas com um litro de mel armazenado em potes esféricos feitos de cera escura (NOGUEIRA-NETO, 1997).

BARDASSI (1998 c.p.), meliponicultor na cidade de Ribeirão Preto, SP, relata que quando encontra um ninho de *T. a. angustula*, sempre consegue coletar outros cinco ou seis ninhos no mesmo quarteirão (10.000m²), sendo raras as vezes que encontrou um só ninho nesta mesma área.

AIDAR (1998 c.p.) encontrou 6 colônias por hectare em mata nativa do município de Miranda, MS, equivalendo a 882 colônias nessa área de reprodução (KERR & VENCOVSKY, 1982). Por outro lado, muitas colônias marcadas não estavam no local após 1 ano, podendo indicar que existe uma dinâmica de migração ou morte de colônias numa mesma área de reprodução. Os ocos marcados e que não continham abelhas não foram abertos para saber se a colônia morreu ou abandonou o local. Todos os ninhos marcados estavam em árvores vivas.

T. a. angustula, mesmo sendo uma espécie cosmopolita nos trópicos, muito ainda está por ser estudada para a caracterização da biologia, genética, etologia e manejo.

1.2.2. *Melipona quadrifasciata*

No genero *Melipona*, *M. quadrifasciata* é uma espécie de abelha muito utilizada nos laboratórios para estudos de biologia, genética e manejo de meliponíneos. Em quase todas as universidades podem ser encontrados ninhos dessa abelha que estão em estudos.

Melipona quadrifasciata distribui-se ao longo da costa brasileira desde a Paraíba até o Rio Grande do Sul (MOURE & KERR, 1950; KERR, 1951). Apresenta duas subespécies: *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier e *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier. A primeira tem bandas terçais descontínuas em machos e operárias e a segunda tem bandas terçais contínuas nas duas castas (MELO & CAMPOS, 1987).

M. q. quadrifasciata pode ser encontrada no Sul de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, principalmente em regiões mais altas e frias. No Sul de Minas Gerais ocorre em altitudes acima de 1.500 m. Na Serra da Bocaina, Serra do Mar, Litoral Norte de São Paulo e em altitudes superiores a 1.600 m, também foram encontrados ninhos desta subespécie (MOURE, 1975).

M. q. anthidioides tem distribuição geográfica mais ao norte, como em Minas Gerais e Rio de Janeiro. Portanto, é subespécie de climas mais quentes. Colônias foram encontradas em locais com elevadas altitudes, como em Petrópolis, RJ e em Minas Gerais, em altitudes superiores a 1.500 m (MELO & CAMPOS, 1987).

Em regiões do estado de São Paulo e Sul de Minas Gerais existe uma zona de hibridação entre as duas subespécies onde são encontrados híbridos contendo vários padrões na distribuição das bandas amarelas nos tergitos abdominais (MOURE & KERR, 1950; KERR, 1951; MOURE, 1975).

1.3. NÚMERO DE ALELOS SEXUAIS NOS APOIDEA

O estudo do número de alelos sexuais na mesma área de reprodução de uma espécie de abelhas pode ser determinado com a observação da produção de machos diplóides na cria de cada nova rainha que inicia postura. Por exemplo, após cada divisão da colônia ou após orfanação de uma colônia, podem ser observados os gonóstilos das pupas de olho-rosa quando desopercula-se as células pela parte inferior do favo com 40-50 dias. A proporção 1:1 de machos e fêmeas indica que os machos são diplóides (ADAMS *et al.*, 1977; KERR, 1987). A diploidia dos machos pode ser confirmada com contagem dos cromossomos pelo método de IMAI *et al.* (1977).

WHITING (1940, 1943) mostrou que *Bracon hebetor* produz 50% de machos diplóides quando há cruzamento entre irmãos devido a uma série de 8 alelos múltiplos xo^1 , xo^2 a xo^8 .

MACKENSEN (1951) ao cruzar rainhas de *Apis mellifera* com seus irmãos ou filhos, obteve 50% de esterilidade. O mesmo autor (1955), encontrou 11 heteroalelos, xo^1 a xo^{11} , numa população de *Apis mellifera*. Trabalhando com a mesma espécie de abelhas, 12 alelos foram encontrados por LAIDLAW *et al.* (1956).

WOYKE (1963) concluiu que as operárias comiam as larvas de machos diplóides de *Apis mellifera* ocasionando 50% de sobrevivência da cria. Criando as larvas em estufa, para que não fossem comidas pelas operárias, Woyke constatou que 50% delas eram machos diplóides. Usando a mesma técnica CHAUD-NETO (1980a, 1980b) conseguiu cruzá-los com rainhas normais e obter operárias triplóides.

O número de alelos sexuais xo numa população de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) foi estudado por ADAMS *et al.* (1977). Este número foi estimado em 18,9 pela

determinação da porcentagem de machos diplóides em 90 colônias de uma população de 500 colônias. PAGE *et al.* (1983) estudaram a distribuição dos alelos xo em populações fechadas de *Apis mellifera*.

KERR *et al.* (1978) sugerem que a determinação do sexo em abelhas ocorre em duas fases: a primeira fase, poucas horas após a postura e a segunda fase, no final da fase de pré-pupa, anteriormente à determinação de todos os discos imaginais. Existe um equilíbrio entre os genes reguladores que atuam sobre um conjunto de genes aditivos (não compensados) determinadores do sexo feminino e sobre os genes parcialmente não aditivos ou não aditivos (compensados), determinadores de masculinidade.

Com relação à origem dos alelos xo na Ordem Hymenoptera, KERR *et al.* (1988) seguem o modelo de HARTL & BROWN (1970), fundamentando-se no fato de que todas as espécies de ordens conhecidas e geneticamente próximas aos Hymenoptera têm fêmeas XX (Strepsiptera, Coleoptera, Diptera, Megaloptera e Siphonaptera). Os grupos haplodiplóides conhecidos e os parentes haplodiplóides filogeneticamente mais próximos, têm fêmeas XX: *Micromelthas depilis* (Coleoptera) e Acarina; Coccoidea e Aleyroidea, próximos de Hemiptera, apresentam fêmeas XX (KERR, 1996).

KERR (1996) sugere que o gene em questão seja curto (poucos nucleotídeos), visto que o número de heteroalelos encontrado foi entre 7 a 24. Em *Apis mellifera* MACKENSEN (1955), LAIDLAW *et al.* (1956) e ADAMS *et al.* (1977) encontraram 11, 12 e 18,4 alelos xo, respectivamente. KERR (1987b) encontrou 20 alelos em *Melipona compressipes fasciculata*. CARVALHO *et al.* (1995) encontraram de 7 a 24 alelos em *Melipona scutellaris*.

As experiências de WOYKE (1976) demonstram que uma população com menos

de 6 alelos xo, isto é, menos de 44 colônias, pode ser extinta em cerca de 15 gerações. Em *Apis mellifera* as larvas de zangões com 2 a 3 dias de vida são comidas pelas operárias (WOYKE, 1963). Em *Melipona quadrifascita*, *Melipona compressipes* e *Melipona scutellaris*, os machos diplóides chegam à fase adulta ou imago e então são mortos pelas operárias, bem como as rainhas que os produzem (CAMARGO, 1982; KERR, 1987; CARVALHO *et al.*, 1995).

A manutenção de populações pequenas com menos de 44 colônias da mesma espécie, promove a diminuição do número de alelos sexuais xo induzindo a produção de machos diplóides (KERR & VENCOVSKY, 1982). Quando há produção de machos diplóides numa colônia de meliponíneo, a rainha é eliminada pelas operárias e a colônia tende a morrer por falta de operárias e de rainha (CAMARGO, 1982; KERR 1987). Em regiões onde o número de colônias é baixo, elas tendem a desaparecer devido à formação de alelos xo em homozigose e isto ocorre com frequência nas pequenas reservas de matas primárias que são conservadas (AIDAR, 1996a, 1997b) e nos criadouros que tenham poucas colônias.

Nos insetos, a capacidade de exploração dos recursos alimentares, de encontrar parceiros reprodutivos e, conseqüentemente, o sucesso ecológico das espécies estão intimamente relacionados à distribuição geográfica dos indivíduos no seu habitat natural (PRICE, 1984; ROUBIK, 1989).

A distância de vôo das espécies de abelhas fornece dados que auxiliam o estudo da área de reprodução e de distribuição da população geneticamente ativa ou população intercruzante da região estudada. Em áreas onde os desmatamentos são freqüentes, esses dados permitem-nos avaliar as possibilidades de homozigose dos alelos xo e de endogamia das espécies, bem como a disponibilidade de alimento próximo às colônias (ROUBIK, 1989).

GARY (1992) cita que M.J.E. Spitzner (1788), descreveu pela primeira vez a

dança das operárias para comunicar a fonte de néctar. FRISCH (1984) estudou os mecanismos de orientação existentes em *Apis mellifera* e concluiu que a posição do sol, as paisagens locais e os odores das fontes de alimento (floradas) auxiliam na navegação das abelhas. LINDAUER (1971) demonstrou que as operárias de *Apis mellifera* conseguem compensar o movimento do sol em sua informação. KERR (1994b) demonstrou que o mesmo ocorre com *Trigona spinipes*.

KERR (1959) fez experimentos empregando alimentador coletivo com xarope de açúcar deslocando-o a distâncias cada vez maiores para avaliar a distância de vôo de várias espécies e obteve os seguintes resultados: *Melipona quadrifasciata* coletou xarope até 2000 m; *Trigona spinipes*, até 840 m; *Plebeia droryana*, até 540 m; *Trigona amalthea*, até 980 m; *Apis mellifera*, até 2800 m.

KERR (1987a) treinou *Melipona compressipes fasciculata* Lep. a buscar xarope num alimentador coletivo e conseguiu afastar operárias à distância de 2470 m. O autor cita que a florada de siriúba (*Avicennia nitida*) impediu a continuidade dos experimentos, pois as abelhas deixaram o alimento artificial para coletar néctar das suas flores.

As espécies *Trigona iridipennis*, *Apis cerana indica* e *Apis florea* voam até 120, 700 e 400 m, respectivamente (LINDAUER, 1971). ROUBIK & ALUJA (1983) mostraram que *Cephalotrigona capitata* e *Melipona fasciata* voltam de 1650 e 2400 m, respectivamente.

O raio de ação das castas reprodutivas (machos e rainhas) pode determinar se a população está isolada reprodutivamente de outras populações e assim pode-se determinar o grau de consangüinidade dessa população e saber se ela está em equilíbrio e livre de ser extinta. Durante o vôo para acasalamento, as rainhas e machos atingem distâncias maiores do que as operárias. WILLE (1983) cita que a distância de vôo de operárias de *Tetragonisca angustula* é

em torno de 600 m. KERR (c.p.) propõe que operárias desta espécie explora os recursos florais até uma distância de 80 m.

1.4. POLIMORFISMO ENZIMÁTICO EM *Meliponinae*.

Os primeiros trabalhos sobre sistemas polimórficos em *Melipona* foram de CONTEL (1972) e CONTEL & MESTRINER (1974), que estudaram 54 colônias de *Melipona subnitida* Ducke, empregando a técnica de eletroforese. Foram identificados 3 tipos de esterases, esterase 1, esterase 2 e esterase 3, com controle genético independente e foi observado polimorfismo em 2 locos (EST-2 e EST-3).

LIMA (1978) fez uma revisão sobre a heterogeneidade molecular em preparações enzimáticas que auxilia os estudos genéticos com abelhas. FALCÃO (1984) estudou 10 espécies de meliponíneos e encontrou polimorfismo para a malato desidrogenase e isocitrato desidrogenase em 3 espécies. A mesma autora detectou polimorfismo para uma forma de esterase em 4 espécies. YONG (1986) também encontrou polimorfismo nos meliponíneos com relação a malato desidrogenase (MDH) e isocitrato desidrogenase (IDH). CONTEL (1980) analisando 51 meliponíneos do Amazonas encontrou 4 espécies com polimorfismo para MDH.

KERR & KRAUSE (1950) e CONTEL & KERR (1976) mostraram que em *Melipona* os acasalamentos ocorreram com apenas um macho. FALCÃO & CONTEL (1991a) não encontraram variabilidade genética ao estudarem a enzima málica em 9 espécies de meliponíneos. As mesmas autoras, estudando 3 colônias de *Plebeia droryana* de Londrina, PR, sugeriram que as rainhas copulam em 11% com mais de um macho ou existe mais de uma rainha fisogástrica numa mesma colônia (hipótese considerada menos provável) porque a segregação para MDH e PGM foi de dois tipos de homozigotos em adição ao heterozigoto.

FALCÃO & CONTEL (1991b) estudando 10 espécies de abelhas brasileiras sem ferrão: *Melipona compressipes* Fabricius; *Melipona marginata marginata* Lepeletier; *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier; *Plebeia droryana*; *Friesella schrottkyi* Friese; *Partamona helleri*; *Scaptotrigona bipunctata*; *Scaptotrigona postica postica*; *Tetragonisca angustula* Latreille *Nannotrigona testaceicornis testaceicornis* Lepeletier, mostraram que apenas *Melipona quadrifasciata anthidioides*. apresentou polimorfismo para a enzima SOD.

CONTEL (1972) e CONTEL & MESTRINER (1974) propuseram que ocorre monomorfismo em esterases de *Melipona quadrifasciata*.

Neste trabalho foi investigado polimorfismo enzimático em populações de *Melipona quadrifasciata* Lep. por meio da eletroforese em gel de amido para avaliação da variabilidade genética com relação às enzimas esterase (EST), isocitrato desidrogenase (IDH), enzima málica (ME), fosfoglicomutase (PGM), superóxidodismutase (SOD), α -glicerofosfato desidrogenase (α PGD), malato desidrogenase (MDH), leucina aminopeptidase (LAP), hexoquinase (HK) e fosfoglicoisomerase (PGI).

1.5. Alimentação artificial para meliponíneos

Este item não poderia deixar de ser incluído, pois a prática da meliponicultura compreende trabalho exaustivo que envolve técnicas apuradas de manejo e muitas horas de trabalho (NOGUEIRA-NETO, 1948, 1970; AIDAR, 1994, 1995a, b, 1996a; AIDAR *et al.* 1995; KERR *et al.*, 1996). Sem manejo adequado, não existe a possibilidade da manutenção de colônias de meliponíneos em bom estado por longos períodos, principalmente colônias que estão sendo submetidas a estresse de revisões freqüentes para coleta de dados.

Quando lidamos com espécies extintas em algumas regiões e de difícil aquisição

de colônias para experimentação, como é o caso de *Melipona quadrifasciata*, *Melipona bicolor* e *Melipona rufiventris*, na região de Ribeirão Preto, SP, a manutenção e divisão de matrizes é a única forma racional para aquisição de material biológico para os experimentos (AIDAR, 1995b). Quando ainda havia florestas nativas nessa região, as espécies acima citadas, bem como a *Scaptotrigona* sp e *Melipona marginata*, eram encontradas naturalmente nas matas.

As abelhas, como todos os organismos, requerem proteínas, carboidratos, sais minerais, vitaminas e lipídios para um desenvolvimento orgânico compatível com o seu potencial genético. O néctar fornece os carboidratos; o pólen, fornece os aminoácidos, os lipídios, os minerais e as vitaminas (HEBERT Jr., 1992).

Mesmo havendo disponibilidade de flores com bom néctar e bom pólen, as colônias fracas não apresentam número de campeiras suficiente para a execução de forrageamento intenso, o que retarda o desenvolvimento da colônia. Com alimentação extra, o desenvolvimento destas colônias pode ser acelerado (AIDAR & CAMPOS, 1994).

A elaboração do alimento artificial para abelhas exige conhecimento das necessidades nutricionais desses insetos e cuidado com algumas substâncias tóxicas, como a lactose, por exemplo (BARKER & LEHNER, 1972b). WALLER (1972) e FRISH (1934) demonstraram que operárias de *Apis mellifera* preferem a sacarose a outros açúcares como fonte de energia. A sacarose apresenta alto valor nutritivo quando comparado aos outros açúcares estudados (BARKER & LEHNER, 1972a).

A alimentação artificial para meliponíneos é necessária devido à falta de flores como fonte de néctar e pólen, e também quando o número de colônias é superior à capacidade de suporte local. Neste último caso estão incluídos os meliponários de produção e

experimentais (ZUCOLOTO, 1994; AIDAR, 1995).

Desta forma, várias composições de proporções diferentes de água e açúcar (NOGUEIRA-NETO, 1970), pólen, mel de meliponíneos e de *Apis*, bem como suplementos vitamínicos (KERR, 1987; AIDAR, 1994), são citados em literatura e utilizados com sucesso.

CAMARGO (1974) desenvolveu uma dieta semi-artificial para meliponíneos por meio da fermentação natural do pólen de *Thypha dominguensis* (tabôa), acrescentando 30 ml de mel e uma amostra de pólen da espécie que se deseja fornecer este alimento semi-artificial para fermentação. Após 30-40 dias o alimento está pronto para ser fornecido às abelhas. Rainhas de *Melipona*, recém-fecundadas, confinadas com operárias que receberam apenas essa dieta semi-artificial, desenvolveram ovário e iniciaram postura, demonstrando não estarem com deficiência nutricional que afetasse as funções orgânicas observadas. A mesma autora demonstra que a técnica pode ser utilizada para *Scaptotrigona* sp.

O levedo de cerveja, o pólen de outras espécies de abelhas e o sal comum, como fonte de sódio e cloro foram objeto de estudos de ZUCOLOTO (1994), mostrando que outros nutrientes também são requeridos pelas abelhas.

O fornecimento de pólen "in natura" para *M. quadrifasciata* pode ser de duas formas: Internamente nas colmeias, em potes artificiais (AIDAR & CAMPOS, 1994 e AIDAR, 1995b) ou naturais e externamente às colmeias na forma de PCA (pólen, canela e açúcar), em alimentador coletivo (AIDAR, 1996b).

2. OBJETIVOS

Estimar número de alelos xo na população de *Melipona quadrifasciata anthidioides* e a sua variação antes e após a introdução de rainhas acasaladas com zangões de outras populações.

Verificar possíveis acasalamentos com mais de um macho em *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Estudar a variabilidade genética na população de *Melipona quadrifasciata anthidioides* por análises isoenzimáticas.

Determinar a diploidia dos zangões das colônias que produzem 50% de machos e 50% de fêmeas por meio da eletroforese.

Estimar a população de alelos xo em população de *Tetragonisca angustula angustula*.

Desenvolver metodologia para a manutenção da variabilidade genética e manutenção de meliponários em áreas urbanas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Número de alelos xo na população de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Os experimentos foram realizados no Meliponário-A, localizado em área urbana, na Rua José da Silva, 868, Jardim Paulista, Ribeirão Preto, SP. Hoje, o meliponário é constituído por 80 colônias de *M. q. anthidioides*; 11 de *Melipona favosa orbignyi* Guerin; 12 de *Melipona bicolor*; 23 de *T. a. angustula*; entre outras colônias de *Scaptotrigona* sp, *Friesella schrottkyi* Friese e *Plebeia* sp.

As divisões de colônias para contagem de machos diplóides foram executadas sempre em épocas de boas floradas, ou seja, para as condições de Ribeirão Preto, SP, de setembro a março. Época em que estão sendo produzidos machos com maior frequência.

As colônias de *M. q. anthidioides* foram iniciadas com 2 favos nascentes, contendo 100 células cada um, em média; alimento (xarope de açúcar e pólen); 100 a 120 abelhas campeiras e 50 a 80 abelhas jovens, no mínimo.

Todas as colônias foram formadas em orfandade seguindo o Método 2 desenvolvido por AIDAR (1995a), isto é, para cada colônia filha formada foram colocados 2-3 favos de crias emergentes, 100-120 abelhas e sem rainha fisogástrica. As colmeias utilizadas foram do tipo cúbicas medindo 20cm internamente e paredes com espessura maior do que 2 cm.

Em sua fase inicial, a colônia foi alimentada com xarope de açúcar (2:1) de 2 em 2 dias na quantidade máxima de 30 ml por alimentação, podendo variar conforme o consumo da colônia. O pólen de abelhas africanizadas foi previamente fermentado usando como inoculante inicial 5% de pólen de *Scaptotrigona* sp mais água, até a mistura estar com testura de pasta. O tempo de fermentação variou de 28 a 40 dias.

O pólen fermentado foi ministrado em potes de cera fechados para evitar ataque de forídeos (AIDAR, 1995a). Cada colônia inicial recebeu o equivalente a 1 pote natural de pólen a cada 15 dias.

Os cálculos para determinação do número de alelos x_0 na população foram feitos com base nos estudos de LAIDLAW *et al.* (1956) e metodologia de KERR (1987b), onde:

$$n=2(N+1)/(H+1) \text{ e } S=\sqrt{n^2(n-2)/2(N+2)}$$

Sendo n o número de alelos x_0 ; H o número de colmeias experimentais com 50% de machos diplóides; N o número total de colmeias experimentais e S o erro padrão.

Pupas-olho-claro de operárias e machos das colônias que apresentaram 50% de machos e fêmeas foram analisadas microscopicamente para contagem de cromossomos seguindo o método de IMAI *et al.* (1977) e IMAI *et al.* (1988).

Foram retirados os testículos das pupas e o material preparado em lâmina foi corado com giemsa mais tampão fosfato 1:30. A contagem do número de cromossomos foi feita sob microscópio óptico com lente de imersão.

Normalmente, as colônias apresentam 100% de crias fêmeas e raramente 100% de machos. Este segundo caso, somente ocorre quando a rainha não foi inseminada. O aparecimento de 50% de machos e 50% de fêmeas, indica que os machos são diplóides, devido ao acasalamento entre parentes. Em *Melipona* a proporção de 1:1 entre machos e fêmeas indica que a rainha que os produziu acasalou-se com macho parente e os seus filhos são diplóides (CAMARGO 1976 e KERR, 1987). Desta forma, de acordo com a bibliografia estudada, sempre que houveram proporções de 1:1 entre machos e fêmeas, considerou-se que os machos eram diplóides.

A observação do primeiro favo da colônia filha foi feita com auxílio de

estereomicroscópio Zeiss (40x) 40 a 45 dias após iniciada a postura pela rainha fisogástrica. As células dos favos foram abertas inferiormente de forma a expor a extremidade posterior do abdome das pupas e foram observados a presença dos gonóstilos nestas crias, o que é característica dos machos.

Os favos não muito danificados pela manipulação e aqueles que não apresentaram 50% de machos, foram devolvidos às colônias após a contagem de fêmeas e machos para prejudicar menos o desenvolvimento das colônias.

3.1.1. Seleção das colônias para cruzamento com populações do Espírito Santo.

De 80 colônias de *M. q. anthidioides* do Meliponário-A, foram selecionadas 10 para serem orfanadas e levadas a 3 diferentes meliponários do Espírito Santo, para que as novas rainhas acasalassem com machos não aparentados e de populações diferentes. As colônias selecionadas foram: 7, 15, 20, 25, 40, 53, 60, 62, 71 e 74. O critério de seleção das colônias foi a condição de terem no mínimo 4 favos de crias e potes de alimento de reserva suficiente para que as abelhas suportassem o estresse da orfandade, transporte e mudança de local. Estas colônias foram orfanadas 2 dias antes de serem levadas para o Espírito Santo.

A coleta das rainhas fisogástricas foi mediante o uso de tubo plástico transparente e perfurado, aberto nas duas extremidades medindo 4 x 2 cm. Este tubo foi colocado verticalmente em cima da rainha de forma a aprisioná-la quando caminhava sobre os favos de crias. Assim que a rainha começava a subir dentro do tubo, este era retirado e tampado nas duas extremidades.

As colônias órfãs foram alimentadas um dia antes de serem fechadas e levadas para os locais de fecundação. Na noite anterior ao transporte, os orifícios de entrada das

colmeias foram fechados com tela metálica de malha fina que fôra presa com auxílio de fita adesiva.

Os recipientes plásticos utilizados para armazenar xarope foram lavados e esterilizados em forno microondas (LATIMER & MATSEN, 1977; SANBORN *et al.*, 1982) para evitar o crescimento de microorganismos que pudessem promover reações químicas como a fermentação. Isto é comum em recipientes com soluções açucaradas e vitaminadas.

3.1.2. Distribuição das colônias nos Meliponários do Espírito Santo

Chegando ao local de fecundação, municípios de São Paulo do Araçê e Domingos Martins, ES, algumas colônias foram colocadas em cavaletes coletivos de ferro e outras foram dispostas conforme as condições locais. Em alguns lugares não foram utilizados cavaletes de metal por apresentarem local adequado à acomodação das colmeias de forma segura e prática.

As colmeias permaneceram no Espírito Santo para fecundação durante 10 dias, de 2/4/97 a 12/4/97. Após este período, as colmeias foram transferidas para o Meliponário-A, em Ribeirão Preto, SP, pelo mesmo processo de transporte citado anteriormente.

Dez dias foi o tempo estimado para que as rainhas virgens fossem aceitas pelas colônias e fecundadas por machos da região ao realizarem o vôo nupcial. Durante este período, as colônias foram alimentadas duas vezes em revisões rápidas procurando evitar estresse excessivo à colônia.

Após o período de dez dias, as colônias foram levadas ao Meliponário-A e dispostas no mesmo local que ocupavam anteriormente. Foram monitoradas até os primeiros favos de crias atingirem idade de 40 dias para contagem da proporção de machos e fêmeas pelo mesmo método descrito no item 3.1. para avaliação de acasalamentos consangüíneos.

3.1.3. Colônias órfãs acasaladas no Espírito Santo e divisão no Meliponário-A.

Após a contagem da proporção de machos e fêmeas, as colônias com rainhas acasaladas com machos do Espírito Santo foram manejadas conforme AIDAR (1996a) até atingirem desenvolvimento para serem divididas (nota 7,0). Neste estágio, as colônias foram orfanadas e a nova rainha acasalada com zangões do Meliponário-A. Suas crias foram monitoradas para avaliação da proporção de machos e fêmeas.

Depois de estar fechada, a colmeia ficou em repouso durante 15 dias para que o processo de substituição de rainha não fosse interrompido. Após este período a colmeia foi aberta para observação da presença de favos novos, o que indica a presença de rainha fisogástrica. Após 40 dias, os primeiros favos de crias foram avaliados quanto à proporção de machos e fêmeas para averiguação de possíveis acasalamentos consanguíneos pela contagem da proporção de machos e fêmeas.

Utilizando o Método 1 para formação de colônias (AIDAR, 1996a), onde as colônias filhas são formadas com 2-3 favos de crias emergentes mais 100-120 abelhas, novas colônias foram formadas com as rainhas acasaladas no Espírito Santo e mantidas na mesma área de reprodução do Meliponário-A.

Outras colônias foram formadas para monitoramento do número de alelos *xo* no Meliponário-A depois da introdução de rainhas acasaladas no Espírito Santo.

3.2. Número de alelos sexuais *xo* na população de *Tetragonisca angustula*.

O método utilizado para determinar o número de alelos sexuais na população de *Tetragonisca angustula* no Meliponário-A foi o mesmo utilizado para estimar o número de alelos na população de *M. q. anthidioides*.

Com *T. a. angustula*, o método para formação de novas colônias consistiu em dividir as colônias matrizes deixando a colônia filha com 4 a 5 favos de crias nascentes ou pupas ainda em desenvolvimento e campeiras. Para a aquisição de campeiras a colônia filha foi colocada no local da colônia matriz e esta afastada de 10 a 500 m de distância, conforme a disponibilidade de espaço no Meliponário-A.

Coletou-se as abelhas jovens por meio de aspirador de insetos e a seguir, estas foram colocadas nas colônias filhas. Estas abelhas são facilmente reconhecidas por apresentarem coloração mais clara que as adultas e quase sempre, quando se retira um favo nascente, muitas abelhas jovens estão aderidas aos favos. Desta forma, as abelhas jovens também podem ser transferidas para a nova colônia e são caracterizadas pela coloração esbranquiçada que possuem nos primeiros 5 dias de vida.

Favos de pólen e mel foram coletados, ou da colônia matriz ou de outras colônias com mais reservas, para suprir de alimento a colônia recém formada. Os potes de pólen e de mel que foram danificados ou abertos durante a manipulação, não foram colocados na colônia filha antes de serem bem lavados e secos, para evitar o ataque de forídeos, formigas e outros predadores.

Quando os favos de crias emergentes colocados nas colônias filhas não apresentavam realeiras, estas foram coletadas de outras colônias. Preferencialmente, as realeiras estavam em estágio final de desenvolvimento para que a colônia filha não ficasse muitos dias sem rainha promovendo crescimento mais rápido da colônia formada. A coloração clara das realeiras caracteriza este estágio.

Após alguns dias a nova rainha realizava o vôo nupcial e iniciava postura. Estes favos novos foram observados após 35-40 dias, fase do desenvolvimento em que as crias estão

no estágio de pupa com olho rosa a escuro.

A observação do primeiro favo da colônia filha foi feita com auxílio de estereomicroscópio Zeiss (40x). As células dos favos foram abertas pela parte inferior, de forma a expor a extremidade posterior do abdome das pupas. Foram observados a presença dos gonóstilos nestas crias, seguindo a mesma metodologia usada no experimento com mandaiaias.

Foram colocados em cada colônia experimental vidros para observação do desenvolvimento do ninho. Este vidro foi disposto entre a tampa e a colmeia e apresentava 4 mm de espessura.

Normalmente, as colônias apresentam 100% de crias fêmeas e raramente 100% de machos. Este segundo caso ocorre quando a rainha não foi inseminada ou fecundada, podendo também, aparecer 50% de machos e 50% de fêmeas que, segundo a literatura, representa acasalamento consanguíneo com a produção de machos diplóides.

Em geral, todas as colônias filhas foram formadas entre os meses de setembro a março. Nesta época, em geral, não há carência de floradas e existe uma produção contínua de machos desta espécie na região de Ribeirão Preto, SP, onde foram realizados os experimentos.

3.3. Polimorfismo enzimático em população de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Cinquenta e duas colônias do Meliponário-A foram amostradas coletando-se 8 operárias de cada uma para serem submetidas a análises por eletroforese em gel de amido (12%) ou de penetrose (13%), conforme a disponibilidade do material no momento.

As amostras de operárias foram homogeneizadas com beta-mercapto-etanol a 0,5% num volume de 150 µl e centrifugadas por 10 minutos a 2.500 rpm. A eletroforese foi realizada em Tampão Poulik modificado. A fonte permaneceu constante por 4 horas com 20

mA, 230 V, e a voltagem no gel de 35V. As pontes foram feitas com papel de filtro Whatman nº3. A coloração empregada foi a cromogênica.

A técnica empregada para IDH, MDH, EST, ME e LAP foi a mesma de CASTANHEIRA & CONTEL (1995); HK, PGI, α PDH, SOD e PGM foram analisadas segundo SANCHEZ (1996). Após a análise de 8 indivíduos por colônia em 12 colônias e não encontrado polimorfismo, foram feitas amostragens das outras colônias onde foram analisados 4 indivíduos para cada sistema não polimórfico.

As operárias foram coletadas mediante aspirador de insetos ou com auxílio de vidro de boca larga (450 ml). No primeiro caso, a colmeia foi aberta e as operárias aspiradas. No segundo caso, o vidro foi colocado na entrada da colmeia e com o formão apícola ou um pedaço de madeira, bateu-se ritimadamente na parede da colmeia até a saída de 10 operárias. Esta operação demorou 30 segundos, aproximadamente, para as colônias com notas acima de 6,0 (AIDAR, 1996a).

As abelhas foram examinadas sob lupa para confirmação do sexo antes de serem submetidas à eletroforese. A confirmação do sexo das abelhas coletadas foi feita mediante a observação das garras do inseto, ou seja, garras duplas referem-se a machos e garras simples a fêmeas. Os sexos também foram diferenciados por meio da observação da presença do tufo de pêlos localizados na extremidade posterior do abdome dos machos. Várias são as características morfológicas que podem ser usadas para diferenciar machos de fêmeas nas abelhas. A garra dupla e a presença do tufo de pêlos foram as duas diferenças usadas por serem mais aparentes e rápidas.

A estimativa da frequência gênica foi feita utilizando-se o programa FREGEN do pacote GENIOC (CABELLO & KRIEGER, 1997). O χ^2 de heterogeneidade foi usado na

comparação entre as 3 populações de *M. q. anthidioides* analisadas, isto é, na população do Meliponário-A, em Ribeirão Preto, SP; na população do Espírito Santo e na população híbrida.

3.4. Manutenção das colônias experimentais

3.4.1. Alimentação proteica

Naturalmente, operárias de mandaia não coletam alimento sólido em alimentadores coletivos. Isto nos levou a utilizar uma metodologia que pudesse estimular as campeiras a coletar pólen fora do estame floral, ou seja, em alimentadores coletivos.

Foram usados alimentadores coletivos com 10 cm de diâmetro por 2,5 cm de altura, para Xarope-A, o qual foi denominado Alimentador 1. O Alimentador 2 media 20 x 10 x 2,5cm, e foi usado para PCA (85% de pólen em pó, 10% de canela em pó e 5% de açúcar cristal).

A canela, o pólen e o açúcar foram misturados em liquidificador doméstico para homogeneização da mistura. O pólen utilizado foi coletado das corbículas de campeiras de abelhas africanizadas com auxílio de coletor de pólen ou comprado em casas especializadas que coletam-no pela mesma metodologia. Este pólen foi desidratado e moído em liquidificador antes de ser misturado à canela e ao açúcar. A esta mistura deu-se o nome de PCA.

Inicialmente, foi fornecido Xarope-A durante 3 dias seguidos no Alimentador 1 a 5 metros da periferia do meliponário e a mesma hora do dia.

Após este período de condicionamento das campeiras foi colocado o Alimentador 2 junto ao Alimentador 1, de forma a ficarem encostados. O Alimentador 2 foi disposto sob o trajeto de vôo das campeiras que deixavam o Alimentador 1. Quando as campeiras retornam para a colmeia, realizam trajetória retilínea. Assim, grande número de campeiras caíam ou

andavam sobre o PCA no Alimentador 2 e voltavam para as colônias impregnadas com o pó.

A exposição dos alimentadores para as abelhas foi de 3 horas a cada dia e durante o período da tarde, horas mais quentes do dia e que não há atividade intensa de coleta de pólen nas flores, para a espécie *M. .q. anthidioides*. No final da exposição dos alimentadores coletivos, estes eram esvaziados, lavados e secos para uso posterior.

Para as abelhas não se afogarem no xarope foi colocado uma placa de madeira fina circular, com mais ou menos 3 mm de espessura e 2 a 3 mm menor do que o diâmetro do alimentador. A madeira foi perfurada para aumentar a área de contacto das abelhas com o xarope.

3.4.2. Controle do principal predador: O Forídeo *Pseudohypocera* sp.

O forídeo é um díptero que se alimenta de material orgânico em decomposição (frutas, principalmente). A fase larval adaptou-se muito bem ao consumo de pólen. Quando dentro da colônia de meliponíneo, seus ovos são postos preferencialmente no pólen armazenado pelas abelhas e suas larvas se alimentam deste pólen causando sérios danos à colônia. Esta, quase sempre morre após alguns dias de invasão, caso não haja intervenção do meliponicultor no sentido de eliminar o parasita. Cada postura pode originar até 70 indivíduos adultos após 3 dias.

Três fases compreendem o ataque de forídeos a uma colônia de meliponíneo. Mediante esta divisão em 3 fases, foram empregados os métodos de manejo para controle deste importante predador das colônias de abelhas sem ferrão, que causa mortes destas e diminuição do número de colônias no meliponário.

A. Fase inicial

A.1. Diagnóstico: Alguns forídeos caminham pelas paredes internas da colmeia (5-10), podendo haver larvas na lixeira mas não nos potes de alimento.

A.2. Tratamento.

A.2.1. Levar a colmeia para dentro de um cômodo fechado e assoprar várias vezes por entre os potes de alimento e pelo invólucro do ninho, até saírem todos os forídeos.

A.2.2. Cobrir a lixeira com uma camada de sal comum de 0,5cm de altura e levar a colmeia para seu local de origem.

A.2.3. Matar os forídeos que ficaram presos no cômodo; a maioria pousa no teto e são fáceis de serem mortos.

A.2.4. Repetir a operação A.2.1. duas vezes ao dia durante 3 a 4 dias.

B. Fase intermediária

B.1. Diagnóstico: muitos forídeos (+ de 20) caminham nas paredes internas da colmeia; larvas no piso, parede e lixeira da colmeia; podendo haver casulos de forídeos; não há larvas nos potes de alimento.

B.2. Tratamento.

B.2.1. Levar a colmeia para dentro de um cômodo fechado e assoprar várias vezes por entre os potes de alimento e pelo invólucro do ninho, até saírem todos os forídeos.

B.2.2. Realizar limpeza no piso da colmeia e esmagar todos os casulos e larvas.

B.2.3. Cobrir o piso da colmeia com camada de sal de 0,3cm de altura.

B.2.4. Repetir a operação A.2.1. duas vezes ao dia durante 4 ou mais dias, até desaparecerem os forídeos.

C. Fase terminal

C.1. Diagnóstico: muitos forídeos (+ de 50) dentro da colmeia, principalmente na face interna da tampa; larvas e casulos espalhados; potes de alimentos infestados por larvas e alguns com aparência úmida na região externa; a rainha cessa a postura.

C.2. Tratamento.

C.2.1. Preparar uma nova colmeia para receber a colônia infestada que será desmembrada e transferida de colmeia.

C.2.2. Levar as duas colmeias para um cômodo fechado.

C.2.3. Transferir para a nova colmeia apenas os favos de crias claros (nascentes), rainha e abelhas. Alimentar com xarope, em potes artificiais apenas para o suprimento diário da colônia que será alimentada diariamente até o desaparecimento de todos os forídeos.

C.2.4. A antiga colmeia deverá ser desinfetada com fogo (flambar com álcool ou com maçarico) e os forídeos restantes no cômodo fechado deverão ser mortos.

D. Profilaxia

D.1. Nunca deixar uma colmeia aberta quando está infestada por forídeos nas imediações do meliponário para não contaminar o ambiente.

D.2. Manter o meliponário sempre limpo, livre de material em decomposição e restos de colônias mortas ou colmeias desabitadas com restos de colônias: cera, potes de alimento vazios, etc.

D.3. As colônias iniciais deverão estar sempre populosas (mais de 180 campeiras) e sem potes de pólen.

D.4. Não danificar potes de pólen durante as revisões.

D.5. A alimentação artificial deve ser progressiva (AIDAR, 1996a) para evitar

excesso de alimento dentro da colmeia.

D.6. O próprio meliponicultor pode proporcionar condições favoráveis aos forídeos quando não adota hábitos de higiene com relação aos resíduos de colônias mortas ou manipuladas. Restos de cera e colmeias velhas abandonadas são abrigos para os forídeos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Alelos sexuais x_0 em população de *Melipona quadrifasciata anthidiodes*.

Antes da introdução das colônias acasaladas no Espírito Santo na população dessa espécie em Ribeirão Preto, 15 colônias foram formadas e contadas as proporções de machos e fêmeas no primeiro favo e 3 colônias apresentaram machos diplóides (Tabela 1). Desta forma, 8 alelos x_0 ($s=0,58$) foram encontrados na população original. Mostrando estabilidade da população com relação ao ‘Efeito Yokoyama e Nei’ (YOKOYAMA & NEI, 1979), já que, o mínimo estabelecido por KERR & VENCOSKY (1982) são 6 alelos para a população estar em equilíbrio.

TABELA 1. Colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* formadas antes da introdução de colônias do Espírito Santo

Número da Colônia	Data Inicial	Início de Postura	Dias p/ Postura	Data de Contagem	Número de Fêmeas	Machos n	Machos 2n
56	26/09/96	10/11/96	45	23/12/96	19	0	0
57	26/09/96	02/11/96	37	20/12/96	21	0	0
59	26/09/96	11/11/96	46	20/12/96	23	0	0
61	29/09/96	07/11/96	40	23/12/96	20	2	0
62	29/09/96	30/10/96	32	20/12/96	19	0	16
64	02/11/96	12/11/96	20	22/12/96	15	0	0
65	19/02/97	10/03/97	19	23/04/97	15	2	0
66	07/01/97	15/01/97	18	25/02/97	16	0	0
67	02/11/96	03/12/96	31	18/01/97	18	0	0
69	20/12/96	10/01/97	21	25/02/97	22	0	0
70	04/11/96	28/11/96	24	12/01/97	17	1	0
72	06/11/96	06/12/96	30	10/01/97	16	0	15
73	07/01/97	15/02/97	38	25/03/97	18	0	0
76	16/01/97	05/02/97	20	25/03/97	27	0	29
77	18/02/97	04/03/97	14	14/04/97	21	0	0

N=15 H=3 n=8 S=3,36

Onde: **N** é o número total de colmeias experimentais; **H** é o número de colmeias experimentais com 50% de machos diplóides; **n** é o número de alelos xo e **S** o erro padrão.

Após a introdução de 9 colônias (uma colônia morreu por ataque de forídeos) contendo rainhas acasaladas com zangões de populações do Espírito Santo (Tabela 2), 25 colônias filhas foram formadas e 2 apresentaram machos diplóides (Tabela 3), indicando que o número de alelos xo subiu para 17,33 ($s=9,23$).

Nesta tabela vemos também que a média de dias entre a orfandade e o início da postura da rainha foi de 19,7 dias ($s=4,85$) com amplitude de 14 a 32 dias.

TABELA 2. Colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* do Meliponário-A orfanadas e levadas ao Espírito Santo

Colônia	Data de Orfandade	N1	Início de Postura	Dias p/ Postura	N2	Data de Contagem	N3	Fêmeas	Machos N	Machos 2n
7	29/03/97	5,3	16/04/97	18	3,9	22/05/97	5,3	30	0	0
15	29/03/97	5,5	17/04/97	19	4	22/05/97	6	31	0	0
20	29/03/97	6	17/04/97	19	5	25/05/97	5,8	28	0	0
25	29/03/97	5	18/04/97	20	4	26/05/97	6	27	0	0
40	29/03/97	6	19/04/97	21	4,5	22/05/97	5,3	19	0	0
53	29/03/97	5	30/04/97	32	2,8	05/06/97	4	32	0	0
60	29/03/97	4,2	19/04/97	21	4	22/05/97	4,8	35	0	0
62	29/03/97	4,2	15/04/97	17	4	22/05/97	4,5	26	0	0
71	29/03/97	5	12/04/97	14	5,5	22/05/97	5,8	29	0	0
74	29/03/97	5,5	14/04/97	16	5	22/05/97	6	24	0	0

Onde: N1 é a nota da colônia no momento da orfandade; N2 é a nota da colônia no momento de início de postura e N3 é a nota da colônia no momento da contagem da proporção dos sexos.

TABELA 3. Colônias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* formadas após a introdução das colônias do Espírito Santo.

Colônia	Data inicial Ou Orf/ção	Início de Postura	Dias p/ Postura	Data de Contagem	Número de Fêmeas	Machos n	Machos 2n
3	20/03/98	10/04/98	21	21/05/98	18	1	0
9	17/04/98	20/05/98	33	30/06/98	21	0	0
15(ES)orf.	31/01/98	22/02/98	22	30/03/98	23	0	0
20(ES)orf.	27/03/98	08/04/98	12	20/05/98	17	0	0
25(ES)orf.	05/09/97	15/09/97	10	24/10/97	22	0	0
30	17/03/98	15/04/98	29	29/05/98	23	0	0
40(ES)orf.	05/09/97	25/09/97	20	29/10/97	24	0	0
43orf.	22/04/98	30/04/98	8	13/06/98	19	2	0
51	26/10/97	10/11/97	15	15/12/97	20	0	0
71(ES)orf.	17/04/98	28/04/98	11	12/06/98	26	0	0
74(ES)orf.	05/09/97	17/09/97	12	20/10/97	20	0	19
60(ES)orf.	02/04/98	21/04/98	19	05/06/98	21	3	0
62(ES)orf.	01/10/97	15/10/97	14	24/11/97	23	0	0
80	10/01/98	29/01/98	19	10/03/98	20	0	18
85	10/01/98	28/01/98	18	12/03/98	26	2	0
88	10/11/97	28/11/97	18	13/01/98	29	0	0
89	27/10/97	03/12/97	37	06/01/98	27	0	0
90	07/10/97	27/10/97	20	01/12/97	18	0	0
91	05/10/97	23/10/97	18	13/12/97	22	1	0
92	20/11/97	11/12/97	21	13/01/98	24	0	0
93	30/10/97	05/12/97	36	13/01/98	26	1	0
95	30/10/97	02/12/97	33	13/01/97	18	0	0
96	27/11/97	12/01/98	46	13/02/98	25	0	0
98	12/01/98	17/02/98	36	28/03/98	21	0	0
99	06/03/98	30/03/98	24	10/05/98	16	0	0

n=17,33 H=2 N=25 s=9,23

Onde: N é o número total de colmeias experimentais; H é o número de colmeias experimentais com 50% de machos diplóides; n é o número de alelos xo e S o erro padrão.

As colônias acasaladas com machos de populações do Espírito Santo não produziram machos diplóides e em apenas uma a rainha não realizou postura devido ao ataque de forídeos, enfraquecendo acentuadamente sem condições de recuperação. Esta colônia foi considerada morta para o experimento em questão. Porém, seus elementos foram empregados na formação de outras colônias. Sendo assim, 90% das colônias apresentaram resultados

positivos com relação ao acasalamento fora do Meliponário-A (Tabela 2).

Os dados demonstram que para a manutenção de meliponários experimentais ou comerciais deve-se manter a variabilidade genética da população introduzindo novas rainhas ou colônias com rainhas acasaladas com populações diferentes para evitar que o número de alelos na população fique abaixo de 6. YOKOYAMA & NEI (1979) sugeriram que uma população poderá ser extinta em 15 gerações; logo se tivermos menos de 4 alelos ou o número de colônias da mesma espécie for inferior a 44, ela sofrerá o mesmo efeito.

As rainhas virgens de *M. q. anthidioides* das colônias formadas e orfanadas demoraram 22,5 ($s=2,12$) e 18,0 ($s=5,65$) dias para fecundar e iniciar postura, respectivamente (Tabela 4). No primeiro caso, a colônia formada passa por um período de reorganização (AIDAR, 1996a) e estruturação dos elementos que a compõem para depois iniciar os trabalhos normais de coleta de alimento no campo e aceitação de uma rainha virgem para efetuar o vôo nupcial e iniciar postura. Por outro lado, quando a colônia não é formada e apenas orfanada, esta se apresenta estruturada e organizada, pronta para aceitação de uma nova rainha. Isto pode explicar o menor período que as colônias orfanadas levam para apresentarem postura da nova rainha fisogástrica.

TABELA 4. Tempo que as colônias formadas e orfanadas de *M. q. anthidioides* demoraram para formarem rainha fisogástrica e iniciarem postura.

	COLÔNIAS FORMADAS	Dias p/ postura	COLÔNIAS ORFANADAS	Dias p/ postura
	3	21	15(ES)orf.	22
	9	33	20(ES)orf.	12
	30	29	25(ES)orf.	10
	51	15	40(ES)orf.	20
	56	45	43orf.	8
	57	37	71(ES)orf.	11
	59	46	74(ES)orf.	12
	61	40	60(ES)orf.	19
	62	32	62(ES)orf.	14
	64	20		
	65	19		
	66	18		
	67	31		
	69	21		
	70	24		
	72	30		
	73	38		
	76	20		
	77	14		
	80	19		
	85	18		
	88	18		
	89	37		
	90	20		
	91	18		
	92	21		
	93	36		
	95	33		
	96	46		
	98	36		
	99	24		
Total (n)	31	-	9	-
Média	-	22,5	-	18
s	-	2,12	-	5,65

Onde: s é o desvio padrão.

Mesmo a colônia 74, após ter sido orfanada no Meliponário-A, tendo apresentado sinais de acasalamento consanguíneo, isto é, 50% de machos, em nenhum momento apresentou sinais de enfraquecimento. Permaneceu sempre forte até a troca de rainha. Em condições naturais, no campo sem estresse de revisões, este fato pode mostrar que uma colônia de meliponíneo supera com facilidade a primeira troca de rainha. Mas a colônia morre se estiver fraca ou se os acasalamentos consanguíneos se repetirem consecutivamente.

Até 17/4/97, 70% das colônias formaram rainha fisogástrica e nenhuma delas apresentou machos diplóides. Todas foram colônias vigorosas e tiveram desenvolvimento mais acelerado quando comparadas com as colônias do Meliponário-A. Isto pode explicar parte do problema que a consangüinidade pode causar em populações finitas de meliponíneos ou mesmo demonstrar a diferença existente entre ecótipos de regiões distintas. A maioria das colônias do Meliponário-A são parentes entre si e as colônias acasaladas no Espírito Santo têm maior variabilidade genética porque suas rainhas acasalaram com zangões de outras. O vigor híbrido de populações vegetais e animais sempre demonstrou melhor adaptabilidade ao meio e maiores produções em geral.

4.1.1. Diferenças entre as colônias do Espírito Santo e do Meliponário-A.

As formas morfológicas ou fisiologicamente diferentes de animais ou plantas de uma mesma espécie que ocupam o mesmo nicho ecológico, são chamadas ecótipos. As frequências alélicas podem diferir de uma população a outra quando são feitos estudos de variações morfológicas entre diferentes populações e a eletroforese de enzimas representa ferramenta fundamental para estimar o grau de divergência nas frequências alélicas. Quanto menor o fluxo gênico entre as populações, mais diferenças poderão ser adquiridas ao longo do

tempo evolutivo (FUTUYMA, 1992).

Nas populações de *M. q. anthidioides* de Ribeirão Preto, SP e do Espírito Santo, algumas diferenças entre as colônias foram notadas mediante observação direta das colônias. Com relação à cera, as colônias do Espírito Santo apresentaram cera mais escura, mais maleável (elástica) e o aroma mais acentuado (perfumada). As operárias das colônias do Espírito Santo são maiores do que as operárias das colônias do Meliponário-A e operárias de colônias da região sul do país. O número de abelhas nas colônias foram relativamente iguais. Os favos de crias são maiores para as colônias do Espírito Santo.

Também foi observado que essas diferenças não são devidas às influências ambientais porque as colônias do Espírito Santo trazidas para Ribeirão Preto continuaram apresentando as mesmas características depois de alguns meses, mesmo estando em colmeias semelhantes e mesmo ambiente das colônias do Meliponário-A.

Neste caso, estamos lidando com duas populações de *M. q. anthidioides* que podem ser classificadas como alopátricas (FUTUYMA, 1992). É material biológico precioso para estudo de evolução, podendo apresentar bases genéticas distintas devido ao isolamento geográfico que existe entre as duas populações.

4.1.2. Tempo para as rainhas das colônias órfãs iniciarem postura

A média de dias para início de postura nas colônias iniciais de *T. a. angustula* e *M. q. athidioides* foi semelhante. Isto indica que o processo de substituição de rainhas foi estatisticamente igual, tanto para mandaçaia (20,25 dias) como para jataí (20,9 dias).

As colônias orfanadas iniciaram postura mais cedo do que as colônias formadas. O tempo que a colônia recém formada leva para ter seus elementos (I-invólucro, FN-favos

nascentes, P-potes de alimento, C-campeiras, O-organização interna. Para maiores detalhes ver AIDAR, 1996) organizados proporcionando condições de produção de células de crias e manutenção da temperatura das mesmas é maior quando comparado às colônias orfanadas, que têm todos os elementos organizados (AIDAR, 1995) e estão prontas a aceitarem rainha virgem para posterior vôo nupcial e iniciar postura.

4.2. Polimorfismo enzimático em população de *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Foi detectado polimorfismo das isoenzimas analisadas em um loco de esterase, o que complementa os estudos de CONTEL (1972) e CONTEL & MESTRINER (1974) que encontraram monomorfismo para esta enzima na população de *M. q. anthidioides* estudada.

O loco para esterase apresentou 2 alelos segregantes, 51,92% para o Est-S, das colônias (Figura 1). A análise estatística dos dados indicou que as 3 populações dessa espécie possuem frequências que estão de acordo com o esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5), sendo que após o teste de χ^2 de heterogeneidade ($\chi^2=1,046$; $gl=1$; $p=0,3064$) foi possível considerar as 3 populações como sendo estatisticamente semelhantes ou homogêneas.

FIGURA 1. Perfil eletroforético das isozimas de esterase de operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Representação dos alelos F (superior) e S (inferior) em gel de penetrose 13%.

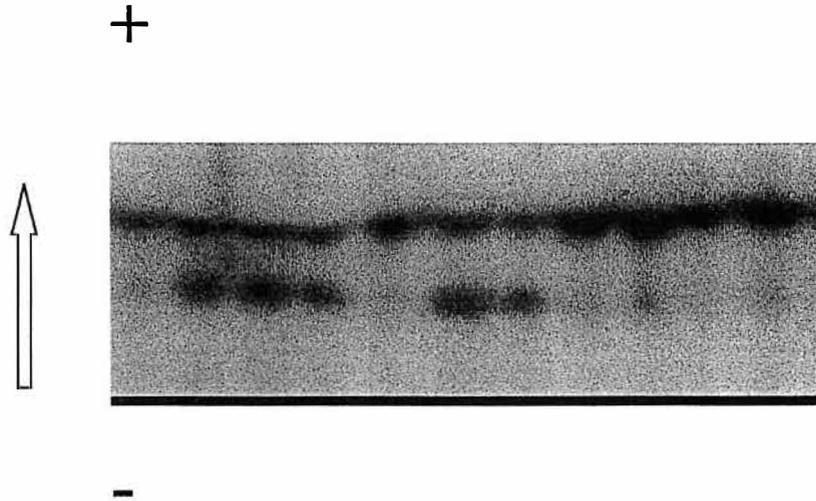


TABELA 5. Frequências alélicas (Est-F e Est-S) e genotípicas para um loco de esterase em *Melipona quadrifasciata anthidioides* nas populações de Ribeirão Preto (RP), Espírito Santo (ES) e Híbridos (RP + ES).

População	Total	SS	SF	FF	S	F	χ^2	GL	p
RP	346	232	102	12	0,817917+0,014594	0,182081	0,036	1	0,8495
ES x RP	40	29	11	0	0,862507+0,042004	0,137493	1,017	1	0,3132
ES	17	14	3	0	0,911763+0,051174	0,088237	0,067	1	0,7958

Foram encontradas operárias homozigotas e heterozigotas, filhas de uma mesma rainha, para esse loco de esterase. Se a rainha copulou com um só macho, isto mostra que ela é obrigatoriamente heterozigota.

Caso as operárias da colônia fossem todas homozigotas, é certo que a rainha copulou com um ou mais zangões com mesmo alelo seu. Sendo todas as operárias

heterozigotas, a rainha acasalou com um ou mais zangões com alelo diferente do seu.

Nos cruzamentos onde foi obtida uma descendência de operárias homozigotas e heterozigotas, a questão era saber se a rainha apresentava homozigose para o mesmo alelo. Caso isso acontecesse, poderia ser afirmado que esta rainha acasalou com mais de um macho, sendo pelo menos um deles portador de alelo distinto aos seus. A verificação desta hipótese implicaria no sacrifício das rainhas, o que não constituiu metodologia racional para indivíduos desta espécie. Desta forma, foi proposto que o assunto será solucionado por meio de metodologia de análise de DNA da hemolinfa dessas rainhas, o que não promoveria a morte delas.

Quando a rainha acasala-se com um só macho e produz filhas heterozigotas e homozigotas, podemos inferir que esta rainha é heterozigota, independente do genótipo do macho.

Por outro lado, caso a rainha tenha copulado com vários machos e apresenta filhas heterozigotas e filhas homozigotas, nada se pode afirmar quanto ao genótipo desta rainha, ou seja, não confirma heterozigose da rainha.

Nas colônias usadas por KERR & KRAUSE (1950) e CONTEL & KERR (1976) as rainhas de *Melipona* se acasalaram com um macho. FALCÃO & CONTEL (1991b) encontraram segregação semelhante em *P. droryana* para as enzimas MDH e PGM e sugeriram que, ou as colônias desta espécie podem conter mais de uma rainha em atividade de postura (poliginia) ou a múltipla fertilização ocorre nessas abelhas. A poliginia nunca foi descrita em *M. q. anthidioides* e também durante 15 anos de trabalho com esta espécie, nunca observei mais de uma rainha fisogástrica numa mesma colônia. Seria mais provável o acasalamento com mais de um macho e no mínimo dois deles com alelos distintos.

Pelos dados apresentados na Tabela 5 pode-se verificar que o loco codificador dessa esterase é polimórfico, sendo que a frequência do alelo mais raro (F) variou de 8,8 a 18% nas populações estudadas.

Das 52 colônias amostradas, 26 apresentaram operárias nas quais foram observados os dois alelos.

4.3. Alelos sexuais xo em população de *Tetragonisca angustula angustula*.

Na população de *T. a. angustula* foram formadas 33 colônias filhas e nenhuma apresentou 50% de machos diplóides (Tabela 6). Seis colônias não foram consideradas colônias experimentais (N) porque não foi observada postura. De acordo com os métodos de KERR (1987b) e admitindo acasalamento com um só macho, estima-se que o número de 56 alelos sexuais foi encontrado nessa população ($s=54,03$). Isto pode indicar que: A) O número de alelos xo é muito grande; B) Que a rainha evita machos com alelos iguais aos seus; C) Que as operárias eliminam os machos com xo igual ao seus ou D) Que há fecundação com mais de um macho.

TABELA 6. Colônias de *Tetragonisca angustula angustula* do Meliponário-A formadas para estimar o número de alelos xo na população.

Número da Colônia	Data Inicial	Início de Postura	Dias p/ Postura	Data de Contagem	Número de Fêmeas	Machos n	Machos 2n
1	02/12/96	15/12/96	13	19/01/97	0	42	0
2	14/01/96	01/02/96	18	12/03/97	30	0	0
3	14/01/96	03/02/96	20	08/03/96	25	0	0
4	17/03/96	12/04/96	26	05/05/96	20	1	0
5	08/01/97	30/01/97	22	21/02/97	0	23	0
6	09/01/97	02/02/97	34	28/02/97	17	0	0
7	21/02/97	05/03/97	12	10/04/97	16	0	0
8	19/03/97	07/04/97	19	18/05/97	34	0	0
9	10/10/95	20/10/95	10	30/11/95	65	0	0
10	20/09/95	20/10/95	30	24/11/95	47	3	0
11	14/01/96	01/02/96	18	24/03/96	39	0	0
12	27/08/96	15/09/96	19	18/10/96	43	2	0
13	27/08/96	16/09/96	20	20/10/96	41	12	0
14	29/08/96	16/09/96	18	18/10/96	38	6	0
14a(orf.)	13/03/98	25/03/98	12	28/04/94	0	31	0
15	27/08/96	17/09/96	21	19/10/96	60	0	0
16	27/08/96	22/09/96	26	25/10/96	28	1	0
17	25/03/97	10/04/97	16	21/05/97	42	3	0
18	09/10/97	30/10/97	21	02/12/97	18	1	0
19	02/12/97	15/12/97	13	20/01/97	29	0	0
20	21/12/95	08/01/96	18	20/02/96	32	0	0
21	27/08/96	20/09/96	24	12/10/96	57	0	0
22	04/03/96	30/03/96	26	06/05/96	38	3	0
23	24/08/95	20/09/95	27	20/10/95	60	0	0
24	20/08/97	05/09/97	16	09/10/97	0	28	0
25	25/11/97	07/12/97	12	12/01/98	33	0	0
26	05/12/97	12/01/98	38	20/02/98	45	0	0
27	06/04/96	14/05/96	38	22/06/96	48	0	0
28	29/08/96	21/09/96	23	23/10/96	33	0	0
29	05/04/98	02/05/98	27	10/06/98	28	0	0
61	19/02/98	13/03/98	22	15/04/98	0	26	0
69	19/02/98	11/03/98	20	12/04/98	0	31	0
70	15/02/98	25/02/98	10	30/03/98	25	0	0
n=56	N=27		689				
H=0	s=54,03		x=20,9				

Onde: **N** é o número total de colmeias experimentais; **H** é o número de colmeias experimentais com 50% de machos diplóides; **n** é o número de alelos xo e **S** o erro padrão.

Considerando que as colônias 13 e 14 (Tabela 6) produziram 25% de machos diplóides, então: $n=18,66$; $N=27$; $H=2$ e $S=10,00$. Esta situação significa que a rainha acasalou-se com um macho com mesmo alelo e outro com alelo diferente.

Sendo uma população que está ocupando as cidades, a espécie *T. a. angustula* adapta-se bem às condições urbanas, e seria esperado que haveria um equilíbrio com relação aos alelos x_0 . Caso contrário esta espécie não seria encontrada nos grandes centros urbanos.

Um fato que acelera a morte de colônias de abelhas nativas na área urbana é o crescente uso de inseticidas pulverizados sem controle entomológico adequado, matando todas as espécies de insetos urbanos, mesmo aqueles benéficos ao homem. A atual prática de controle do mosquito transmissor da dengue, que vem sendo utilizada na maioria dos municípios agrava o problema. Sabe-se que este controle não extermina a fase larval do mosquito, que em menos de 3 dias torna-se adulto e o princípio ativo do veneno pulverizado na atmosfera já não tem mais efeito, já que este inseticida tem atividade de 8 horas apenas. Para o extermínio do mosquito da dengue com pulverizações nas ruas só mesmo realizando a aplicação na atmosfera de dois em dois dias durante semanas, o que inviabiliza este sistema de controle, tanto para custos como para a saúde pública. Algumas administrações municipais mais preocupadas com a saúde pública não efetuam as pulverizações de inseticidas na atmosfera, é o caso de Campo Grande, MS, por exemplo.

As colônias 1, 5, 14a, 24, 61 e 69 produziram apenas machos nos seus favos iniciais (Tabela 6). Neste caso as rainhas não se acasalaram e iniciaram postura de óvulos sem espermatozóides ou as operárias dessas colônias realizaram postura antes da rainha ter sido fecundada e iniciado postura. SILVA (1973) verificou que as operárias de Meliponinae podem

realizar postura quando a rainha fisogástrica é jovem. CAMARGO (1976) cita que a produção de machos haplóides pela rainha fisogástrica de *M. quadrifasciata* ocorre somente quando ela é velha, o que desconsidera a hipótese de a rainha ter feito postura de ovos não fecundados.

As colônias 1 e 61, mesmo apresentando só machos em seus favos iniciais, tornaram-se colônias com postura normal e prosperaram. As outras colônias pereceram. Sugerindo que estas (12,1%) não foram fecundadas e tornaram-se zanganeiras e as outras duas colônias a rainha iniciou postura depois.

Para as colônias 7, 9, 19, 25 e 70 que iniciaram postura 12, 10, 13, 12 e 10 dias após sua formação, respectivamente, considera-se que as pupas nas realeiras estavam em estado final de desenvolvimento (farato) quando a colônia foi formada porque neste curto espaço de tempo não haveria possibilidade de desenvolvimento completo das pupas contidas nas realeiras para nascimento de uma rainha virgem se as pupas estivessem em fase de olho preto ou anterior. Talvez as rainhas das colônias 13 e 14 tenham sido fecundadas por 2 zangões (n=18,66).

As colônias filhas de *T. a. angustula* demoraram 20,9 dias para que a rainha virgem acasalasse e iniciasse a postura (Tabela 6).

4.3.1. Estabilidade da população de *Tetragonisca angustula angustula*.

Considero a espécie *T. a. angustula* um tanto atípica no que se refere à estabilidade da sua população de colônias quando comparamos com a população de colônias de *M. q. anthidioides* e outras espécies de abelhas sem ferrão. Alguns comportamentos são muito distintos, como por exemplo a permanência da colônia no local de nidificação. Muitas colônias

desaparecem e aparecem no mesmo local ou substrato de nidificação ao longo do tempo.

Quando foram marcadas vinte colônias de *T. a. angustula* em mata nativa de Aquidauana, MS, foi visto que o tronco pode ser abandonado ou a colônia morre. Em dezembro de 1996, 40 colônias foram mapeadas e após quatro meses 6 colônias (30%) não estavam no lugar, ou seja, o tronco não continha nenhum enxame, apenas a marca de identificação e o orifício de entrada da colônia. Isto pode mostrar que a população de colônias de *T. a. angustula* é menos estável do que as do gênero *Melipona* quando comparada à população de colônias de *M. q. anthidioides* do Meliponário-A, havendo flutuação devida a morte de colônias ou migração das mesmas. Uma das razões pode ser o ataque por *Lestrimellita limao*. Todavia, no Meliponário-A ocorre a mesma flutuação populacional e não há o ataque desta última.

No Meliponário-A, notou-se que colmeias abandonadas por enxames de jataí ou que tiveram a colônia morta por qualquer motivo, casualmente foram habitadas por outros enxames sem origem conhecida.

Popularmente, diz-se que *T. a. angustula* as abelhas jataís vão embora, abandonando sua morada, e depois “retornam” ao mesmo substrato, ocupando-o com número de abelhas elevado. Não se sabe se a colônia morre ou migra com rainha virgem, caso o dito popular esteja correto.

É de se supor que em algumas espécies, tais como *Plebeia droryana* e *Tetragonisca angustula* a substituição de rainhas seja mais freqüente do que em *Melipona*. CONTEL (1980) citou que de 13 colônias experimentais 8 substituíram rainhas em 2 anos, indicando que o tempo de vida fértil dessas rainhas não ultrapassa 2 anos. KERR *et al.* (1962) encontraram 108.260 espermatozóides por mm³ de sêmen na espermateca de rainha de *T. a.*

angustula recém fecundada. Porém este dado pode estar subestimado (KERR c.p.). CAMARGO (1976), estudando *Melipona quadrifasciata*, encontrou 1,3 milhões/mm³. Isso mostra que em *T. a. angustula* a troca de rainhas é mais freqüente e os riscos da colônia ficar sem rainha e morrer são maiores. Estes dados podem explicar a maior flutuação da população das colônias de *T. a. angustula* com relação à flutuação da população de *M. q. anthidioides*.

Portanto, o estudo do número de alelos sexuais xo numa população de *T. a. angustula*, dependendo do tempo que os experimentos durarem, deve levar em consideração essa flutuação quando avalia-se o número de colônias numa determinada área.

5. CONCLUSÕES

O número de alelos sexuais xo na população de *M. q. anthidioides* do Meliponário-A antes da introdução de colônias com rainhas acasaladas com zangões de populações do Espírito Santo foi: $n = 8$ ($S = 3,36$). Após a introdução de 9 colônias com rainhas acasaladas com zangões de populações do Espírito Santo, o número de alelos sexuais xo no Meliponário-A aumentou para $n = 17,33$ ($S = 9,23$). Este método é mais apropriado para os meliponicultores que não gostam de trocar rainhas ou colônias com outros meliponicultores.

Para evitar a morte de colônias de meliponíneos devida à produção de machos diplóides quando as rainhas acasalam com machos aparentados, a introdução de colônias com rainhas acasaladas com zangões de populações diferentes, ou seja, com zangões não parentes no meliponário, é manejo indicado para a manutenção da variabilidade genética da população geneticamente ativa do meliponário.

A determinação da diploidia dos machos das colônias que apresentaram proporção dos sexos 1:1 pela segregação de Est-S e Est-F em heterozigose não foi possível por não

termos encontrado uma colônia com a proporção 1:1 de Est-S e Est-F.

Foi encontrado polimorfismo apenas para um gene de esterase, sendo 51,92% de Est-F das colônias de *M. q. anthidioides* analisadas.

O χ^2 de heterogeneidade demonstrou que as 3 populações de *M. q. anthidioides* estudadas são estatisticamente semelhantes.

Não foi confirmado que em *Melipona quadrifasciata* as rainhas se acasalam com mais de um macho, mas sugeriu-se experimentos que definirão esta dúvida por intermédio de exames de paternidade utilizando as mesmas técnicas empregadas para humanos.

A população de *T. a. angustula* do Meliponário-A não apresentou indícios de estar sob o efeito Yokoyama & Nei porque nenhuma colônia formada ou orfanada apresentou 50% de machos e 50% de fêmeas. Indicando que a população tem um número grande de alelos xo, isto é, superior a 56 ($s=54,03$). Todavia, se as rainhas virgens das colônias 13 e 14 foram inseminadas por mais de um macho, então o número de alelos xo será 18,66.

Durante a captura das rainhas, o procedimento que menos causou estresse à colônia consistiu em abrir a colmeia e procurá-la sem remover os favos de crias. Caso a rainha fisogástrica não tenha sido encontrada, deixou-se a parte superior do invólucro do ninho removida, de maneira a ficar exposto o favo de crias novas. Pois são nestes favos que a rainha fisogástrica se encontra com mais frequência. Após a remoção das placas de cera da parte superior do invólucro do ninho, a colmeia foi fechada e novamente aberta de 30 em 30 minutos, até que a rainha fosse capturada. A acomodação de um vidro superior na colmeia e observação constante até encontrar a rainha também deu bons resultados, porém este método interrompeu por mais tempo as atividades normais das operárias que passaram a trabalhar na vedação das frestas entre o vidro e as paredes laterais da colmeia.

As colônias de *M. q. anthidioides* formadas demoraram 4,5 dias a mais que as colônias orfanadas, o que pode significar mais tempo gasto em reorganizar a nova colônia. Estas demoraram 18 dias para terem rainha fecundada realizando postura. As colônias de *T. a. angustula* formadas e orfanadas demoraram 20,9 dias para obterem rainha fisogástrica.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABSY, M. L. & KERR, W.E. (1977). Algumas plantas visitadas para obtenção de pólen por operárias de *Melipona seminigra merrillae* em Manaus. *Acta. Amaz.*, 7(3):309-315.
- ABSY, M.L.; BEZERRA, E.B. & KERR, W.E. (1980). Plantas nacteríferas utilizadas por duas espécies de *Melipona* da Amazônia. *Acta. Amaz.*, 10(3):271-81.
- ABSY, M.L.; CAMARGO, J.M.F.; KERR, W.E. & MIRANDA, I.P.A. (1984). Espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hymenoptera; Apoidea) para coleta de pólen na região do Médio Amazonas. *R. Bras. Biol.* 44(2):227-237.
- ADAMS, J.; ROTHMAN, E.D.; KERR, W.E. and PAULINO, Z.L. (1977). Estimation of the number of sex alleles and queen mating from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera* L. *Genetics*, 86:583-596.
- AIDAR, D.S. (1995a). Estudo comparativo dos sistemas de reprodução em Meliponinae e Apinae (Hymenoptera, Apidae): conseqüências ecológicas. In: *Ann. Cong. Entomologia* (15):95, Caxambu, MG, Brasil.
- AIDAR, D.S. (1995b). **Multiplicação Artificial e Manejo de Colônias de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera Apidae, Meliponinae)**. Viçosa, MG, 85p (Tese M.S.) (I).
- AIDAR, D.S. (1996a). A Mandaçaia: Biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (HYMENOPTERA, APIDAE,

- MELIPONINAE). *Série Monografias (4):103pp. Brazilian Journal of Genetics.*
- AIDAR, D.S. (1996b). Proteic feeding to *Melipona quadrifasciata* Lep. on without flowers seasons (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: *Ann. XV Panamerican Congress of Veterinary Sciences I:85*, Campo Grande, MS, Brasil.
- AIDAR, D.S. (1997a). Preservação de meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): Inclusão na Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. *IBAMA/MMA-Sup. Estadual/SP, Protocolo: 02027.006519/97-34*, Ribeirão Preto 27 de junho de 1997.
- AIDAR, D.S. (1997b). Meliponicultura e Ecossistema: Preservação, Formação de Colônias, Manejo e Alimentação de Meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: *Ann. Simpósio Paranaense de Apicultura 12:48-55*. Guarapuava, PR, Brasil.
- AIDAR, D.S. (1997c). Meliponíneos e Ecossistema: Importância da Preservação das Espécies (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: *INFAM - Informativo Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES, Brasil.*
- AIDAR, D.S.; CAMPOS, L.A.O. (1994). Resposta de meliponíneos à alimentação artificial (*Melipona quadrifasciata* Lep, MELIPONINAE, APIDAE). *Ann. Enc. Etologia 12:105-106*.
- AIDAR, D.S.; CAMPOS, L.A.O.; POMPOLO, S.G.; MESSAGE, D.; AIDAR, T. (1995). Influência ambiental na multiplicação artificial de meliponíneos: *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). In: *Ann. Congr. Entomologia (15):215*, Caxambu, MG, Brasil.
- BARKER, R.J. & LEHNER, Y. (1972a). Acceptance and sustenance value of naturally occurring sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J.*

Exp. Zool. 187:277-286.

- BARKER, R.J. & LEHNER, Y. (1972b). Influence of diet on sugars found by thin-layer chromatography on thoraces of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Exp. Zool.*, 188:157-163.
- BAZLEN, K. (1997). Erst Analysen zu Inhaltsstoffen von Honigen Brasilianischer Stachelloser Bienen. *Abstr. Soziale Insekten, IUSSI-Tagung Graz, p.17*, Eigenverlag, Graz Wüzburg.
- BEGO, L.R.; MAETA, Y.; TESUKA, T.; ISHIDA, K. (1989). Floral preference and flower constancy of a brazilian stingless bee, *Nannotrigona testaceicornis* kept in a greenhouse (Hymenoptera, Apidae). *Bull. Fac. Agric., Shim. Univ.*, 23:46-54.
- CABELLO, P.H. & KRIEGER, H. (1997). Genioc: Sistema para análise de dados de genética. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.
- CAMARGO, C.A. (1974). Produção de machos diplóides de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae). *Cien. Cult.*, 267p.
- CAMARGO, C.A. (1976). **Determinação do sexo e controle de reprodução em *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae)**. Ribeirão Preto, USP, Faculdade de Medicina. 140p (Tese D.S.). (II)
- CAMARGO, C.A. (1982). Control of production of *Melipona quadrifasciata* diploid males by workers bees (Hym., Apidae). In: *The biology of Social Insects*. (Breed, M.D., Michener, C.D. and Evans, H.E., eds.). *Proceedings of the 9th Congress of IUSSI*. Boulder, CO, USA. Westview Press, pp. 248-249.
- CAMARGO, J.M.F. & POSEY, D.A. 1990. O conhecimento dos Kayapó sobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponinae, Apidae, Hymenoptera): Notas adicionais. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Ser. Zool.* 6:17.
- CAMARGO, J.M.F. (1994). Biogeografia de Meliponini (HYMENOPTERA, APIDAE,

- APINAE): a fauna amazônica. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, I, Ribeirão Preto. *Anais do 1º Encontro Sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, F.F.C.L.R.P., USP 1:46-59.
- CAMILLO, E. (1996). Utilização de espécies de *Xylocopa* (HYMENOPTERA, ANTHOPHORIDAE) na polinização do maracujá amarelo. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, I, Ribeirão Preto. *Anais do 2º Encontro Sobre Abelhas*, Ribeirão Preto, F.F.C.L.R.P., USP 1:141-146.
- CARVALHO, G.A.; KERR, W.E.; NASCIMENTO, V.A. (1995). Sex determination in bees. XXXIII. Decrease of xo heteroalleles in a finite population of *Melipona scutellaris* (Apidae, Meliponini). *R. Bras. Genet.* 18, 1, 13-16.
- CASTANHEIRA, E.B. & CONTEL, E.P.B. (1995). Isoenzymes related to flight activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): Evidence of postranslational modification of the hexokinase and detection of new glycerol-3-phosphate dehydrogenase variants. *Biochem. Genet.* 33:365-375.
- CHAUD-NETO, J. (1980a). Estudos biológicos com rainhas triplóides de *Apis mellifera*. *Ciência e Cultura* 32(5):611-615.
- CHAUD-NETTO, J. (1980b). Estudos biológicos com rainhas triplóides de *Apis mellifera*. I. Produção de ovos abortivos por rainhas virgens. *Ciência e Cultura* 32(4):483-486.
- CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLI, D.S. (1991). Analyse pollinique, propriétés physicochimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. *Apidol.* 22:61.
- CONTEL, E.P.B., (1972). **Aspectos genéticos e biológicos obtidos a partir de estudos de proteínas, em duas espécies de Melipona.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, USP, São Paulo. Tese Mestrado, 104p. (II)

- CONTEL, E.P.B. (1980). **Variabilidade proteica em populações naturais de abelhas da Amazônia**. Tese livre Docência FMRP/USP, Ribeirão Preto, SP, 120pp.
- CONTEL, E.P.B. & MESTRINER, M.A. (1974). Esterase polymorphisms at two loci in the social bee. *J. Hered.* **65**:349-352.
- CONTEL, E.P.B. & KERR, W.E. (1976). Origin of males in *Melipona subnitida* estimated from data of an isozymic polymorphic system. *Genetica* **46**:271-277.
- FALCÃO, T.M.M.A (1984). **Polimorfismos proteicos em populações naturais de abelhas brasileiras**. Tese Doutorado FMRP/USP, 231pp. (II)
- FALCÃO, T.M.M.A & CONTEL, E.P.B. (1991a). Genetic variability in natural population of Brazilian social bees. II. Electrophoretic data for PGM and MDH give evidence for multiple fertilization in stingless bees. *Rev. Bras. Genet.* **14**(1):47-59.
- FALCÃO, T.M.M.A & CONTEL, E.P.B. (1991b). Genetic variability in natural population of Brazilian social bees. III. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD and IDH. *Rev. Bras. Genet.* **14**(1):61-72.
- FALK, S. (1991). A review of the scarce and threatened wasps and ants of Great Britain. Peterborough, UK; Nature Conservancy Council for England. *Research and Survey in Nature Conservation* No. 35, ii+344pp. (In: Apic. Abst. 1992 **43**:196-197).
- FERREIRA, F.H.N. (1993). **Aspectos da estratégia reprodutiva em *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. Univ. São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, 105p (Tese Mestrado). (II)
- FOWLER, H.G. (1979). Responses by a stingless bee to a subtropical environment. *Rev. Biol. Trop.* **27**:111.
- FRISCH, Karl. (1984). *La vida de las abejas*. Ed. Labor, S.A., Barcelona, Espanha, 239p.

- FUTUYMA, D.J. (1992). **Biologia evolutiva**. Trad. Mario de Vivo e Fábio M. Sene, 2^a ed., Ribeirão Preto, SP, Soc. Bras. Genética/CNPq, 87-157pp.
- GARY, N.E. (1992). Activities and behavior of Honey Bees. *In: The hive and the honey bee*. Chapter 8. Edited by Dadant & Sons, Hamilton, Illinois, 269-372p.
- GIMENES, M. & MARQUES, M.D. (1996). Polinização das flores de *Ludwigia elegans* em três localidades no estado de São Paulo. *In: Anais do Encontro Sobre Abelhas* 2:336.
- HAMILTON, W.D. (1994). Roles of kinship, recognition and disease in social evolution. *In: Anais do 1º Encontro Sobre Abelhas, de Ribeirão Preto*. Ribeirão Preto, SP, 1:3-16.
- HARTL, D.L.; BROWN, S.W. (1970). The origin of male haploid genetic systems and their expected sex ratio. *Theor. Pop. Biol.* 1:165-190.
- HEBERT Jr., E.W. (1992). Honey bee nutrition. *In: The hive and the honey bee*. Chapter VI. Edited by Dadant & Sons, Hamilton, Illinois, 197-224p.
- IHERING, H. (1932). A uruçu na apicultura nordestina. *Chác. Quintais* 46:292-296.
- HOFFMANN, M. & PEREIRA, T.N.S. 1996. Polinização do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG) na região de Campos dos Goytacazes, RJ. *In: Anais do Encontro Sobre Abelhas* 2:330.
- HOYT, Erich. (1992). Conservação dos Parentes Silvestres das Plantas Cultivadas. Trad. Lídio Coradfin. ADDISON-Wesley IBEROAMERICANA, Wilmington, Delaware, III./S.A. 52pp.
- IMAI, H.T.; CROZIER, R.H. & TAYLOR, R.W. (1977). Karyotype evolution in Australian ants. *Chromossoma* (Berl.) 59:341-393.
- IMAI, H.T.; TAYLOR, R.W.; CROSLAND, M.W.T. & CROZIER, R.H. (!988). Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* 63:159-185.

- IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A; CORTOPASSI-LAURINO, M. & RAMALHO, M. (1984). Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Bolm. Zool. Univ. S.Paulo* 8:115.
- IWAMA, S. & MELHEM, T.S. (1979). The pollen spectrum of the honey of *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae). *Apidol.* 10:275.
- KERR, W.E. (1951). Bases para o estudo da genética de populações dos Hymenoptera em geral e dos Apinae sociais em particular. *Anais da Escola Superior de Agric. "Luiz de Queiroz"*, 8:219-341.
- KERR, W.E. (1959). Bionomy of meliponids-VI-Aspects of food gathering and processing in some stingless bees. *Symposium on food Gathering Behavior of Hymenoptera*. Cornell Univ. Ithaca 24:31.
- KERR, W.E. (1987a). **Biologia, manejo e genética de *Melipona compressipes fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae)**. Univ. Fed. Maranhão, São Luiz, MA, 141p. (Tese para Titular). (III)
- KERR, W.E. (1987b). Sex determination in bees. XXI. Number of xo-heteroalleles in a natural population of *Melipona compressipes fasciculata* (Apidae). *Insectes Sociaux* 34:274-279.
- KERR, W.E. (1994a). Progresso na genética de abelhas. *Anais do X Congresso Brasileiro de Apicultura* 10:264-277, Pousada do Rio Quente, GO.
- KERR, W.E. (1994b). Communication among *Melipona* workers (Hymenoptera, Apidae). *J. Insect Behav.* 7(1):123-128.
- KERR, W.E. (1996). Os heteroalelos xo nas populações de himenópteros. *In: Anais II Encontro Sobre Abelhas* 2:3-11, Ribeirão Preto, SP.
- KERR, W.E & KRAUSE, W. (1950). Contribuição para o conhecimento da bionomia dos

- Meliponini. Fecundação da rainha em *Melipona quadrifasciata* Lep. *Dusenía* 1(15):275-282.
- KERR, W.E. & MAULE. (1964). Geographic distribution of stingless bees and its implications (Hymenoptera, Apidae). *J. New York Ent. Soc.*, 57:2-17.
- KERR, W.E. & VENCOVSKY, R. (1982). Melhoramento genético em abelhas I. Efeito do número de colônias sobre o melhoramento. *Rev. Brasil. Genét.* 5:279-285.
- KERR, W.E., ZUCCHI, R., NAKADAIRA, J.T. & BUTOLO, J.F. (1962). Reproduction in the social bees (Hymenoptera, Apidae). *J. of the New York Entom. Soc.* 70: 265-276.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. (1994). **Relatório da expedição à Estação Ecológica Mamirauá (30/01 a 08/02/1994)**. Projeto Mamirauá. Univ. Fed. de Uberlândia, Departamento de Biociências, Laboratório de Genética. 103p.
- KERR, W.E.; CUNHA, R.; PISANI, J.F. (1978). Genética de determinação do sexo XII. Aplicação de métodos numéricos para agrupar sexos e castas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. (Apidae). *Rev. Brasil. Biol.* 38(2):319-394.
- KERR, W.E.; MONTEIRO, S.G.; KERR, H.A.S. (1988). Sex determination in bees. XXV. Adaptative value of the xo gene in its origin. *Brazilian Journ. Gen.* 11(2):469-473.
- KERR, W.E.; NASCIMENTO, V.A.; CARVALHO, G.A. (1994). Há salvação para os Meliponínios? In: *Anais do 1º Encontro Sobre Abelhas 1*:60, Ribeirão Preto, SP.
- LAIDLAW, H.H., GOMES, F.P. & KERR, W.E. (1956). Estimation of the number of lethal alleles in a panmitic population of *Apis mellifera* L. *Genetics* 44:179-188.
- LATIMER, J.M. & MATSEN, J.M. (1977). Microwave oven as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *J. Cl. Microbiol.* 6:340-342.
- LINDAUER, M. (1971). **Communication Among the Social Bees**. Cambridge, Massachusetts.

Harvard Univ. Press.

- LIMA, L.M.K.S. (1978). **Investigação de esterases e proteínas não catalíticas em várias espécies de abelhas**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.146pp (Tese Mestrado). (II)
- MACKENSEN, O. (1951) Viability and sex determination in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Genetics* 36:500-509.
- MACKENSEN, O. (1955). Further studies on a lethal series in the honeybee. *J. Hered.* 46:72-74.
- MATEUS, S.; MECHI, M.R. & BEGO, L.R. (1996). Abundância relativa, sazonalidade e preferência floral das abelhas da família Apidae, em área natural de cerrado na Estação Ecológica de Jataí. *In: Anais do Encontro Sobre Abelhas* 2:338.
- MELO, G.A.R. & CAMPOS, L.A.O. (1987). Variação do padrão de faixas na população de *Melipona quadrifasciata* Lepelletier, 1936 no Estado de Minas Gerais (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *XIV Congresso Brasileiro de Zoologia*. Juiz de Fora, MG.
- MICHENER, C.D. (1961). Observation on the nests and behavior of *Trigona* in Australia and New Guinea (Hymenoptera, Apoidea) *Am. Mus. Nov.*, 2026:1-46, 73.
- MICHENER, C.D. (1974). **The social behavior of the bees. Comparative study**. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 404pp.
- MICHENER, C.D. (1979). Biogeography of the bees. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 66:277:347.
- MOURE, J.S. (1975). Notas sobre as espécies de *Melipona* descritos por Lepelletier em 1836 (HYMENOPTERA, APIDAE). *Rev. Brasil. Biol.*, 35(4):615-23.
- MOURE, J.S. & KERR, W.E. (1950). Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (HYMENOPTERA, APOIDEA). *Dusenian* 12:105-29.

- MOURE, J.S. & SAKAGAMI, F. (1962). As mamangabas sociais do Brasil (*Bombus Latr.*)(Hym. Apoidea). *Studia Entomologica* 5(1-4):65-194.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1948). A colmeia racional para algumas de nossas abelhas que não ferroam. *Chácaras e Quintais* 77:559-561.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1970). **A criação racional das abelhas indígenas sem ferrão**. 2a Ed. Tecnapis, São Paulo, SP, 365p.
- NOGUEIRA-NETO, P. (1997). **Vida e criação de abelhas Indígenas Sem Ferrão**. Editora Nogueirapis, São Paulo, SP. 445p.
- PAGE Jr., R.E. & METCALF, R.A. (1982). Multiple Mating, sperm utilization, and social evolution. *Am. Nat.* 119: 263-281.
- PAGE Jr., R.E.; LAIDLAW, H.H. & ERICKSON, E.H. (1983). Closed population honey bee breeding. 3. The distribution of sex alleles with gyne supersedure. *J. Apic. Res.* 22:184-190.
- PALACIO, M.A. (1991) **Efeito da inseminação instrumental e da endogamia na dinâmica de populações de abelhas européias e africanizadas na migração de espermatozoides para a espermoteca de rainhas de *Apis mellifera* L.** Univ. de São Paulo, Fac. de Med. de Ribeirão Preto (Tese M.S.).
- PRICE, P.W. (1984). **Insect Ecology**. by John Wiley & Sons, New York, United States of America. 607p.
- RODRIGUES, W. & VALLE, R.C. (1964). Ocorrência de ocos em matas de baixio da região de Manaus, Amazonas. Estudo Preliminar. *Publi. INPA, Série Botânica* 16:1-8.
- ROUBIK, D.W. (1983). Nest and colony characteristics of stingless bees from Panamá (Hymenoptera: Apidae). *J. Kans. Entomol. Soc.* 56:327.
- ROUBIK, D.W. (1989). **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge, University

Press, New York, 514p.

- ROUBIK, D.W. & ALUJA, M. (1983). Flight ranges of *Melipona* and *Trigona* in tropical forest. *J. Kansas Ent. Soc.* 56(2):217-222.
- SANBORN, M.R.; WAN, S.K. & BULARD, R. (1982). Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl. Microbiol.* 44:960-964.
- SANCHEZ, A. (1996). **Relacione filogenética en los clósters buzzatii y mantensio (grupo replets) de Drosophila.** Universitat Autònoma de Barcelona (Tese Doutorado). (IV)
- SILVA, D.L.N. (1973). **Estudos bionômicos em colônias mistas de Meliponinae (Hymenoptera, Apoidea).** Fac. Fil., Ciênc. E Letras de Ribeirão Preto, SP, USP, 144p. Tese Doutorado. (IV)
- SOARES, A.C. 1994. Abelhas melíponas: um tesouro Latino americano. *Ecologia e Desenvolvimento* 46:19-23.
- WALKER, I. (1991). **Algumas considerações sobre um programa de zoneamento da Amazônia. 2º capítulo de "Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia: fatos e perspectivas".** Ed. Adalberto L. Val., Roberto Figlionolo, Eliana Feldberg. INPA, Manaus, AM 1:37-46.
- WALLER, G.D. (1972). Evaluating responses of honey bees to sugar solutions using an artificial-flower feeder. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 65:857-862.
- WHITING, P.W. (1940). Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics* 28:365-382.
- WHITING, P.W. (1943). Sex-linkage in *Pteromalus*. *Am. Natur.* 64:377-379.
- WILLE, A. (1983). Biology of the stingless bees. *Annu. Rev. Entomol.* 28:41.
- WOYKE, J. (1963). What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony. *J. Apic. Res.*

2:73-76.

WOYKE, J. (1967). Diploid drone substance (canibalism substance). *XXI Int. Neekeep. Cong. Prelim. Sci. Meet. Summ. Paper 10*:57-58.

WOYKE, J. (1976). Population genetic studies on sex alleles in the honeybee using the exemple of Kangaroo Island Bee Sanctuary. *J. Apic. Res.* **15**:105-123.

YOKOYAMA, S. & NEI, M. (1979). Population dynamics of sex-determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. *Genetics* **91**:609-626.

YONG, H.S. (1986). Allozyme variation in the stingless bee *Trigona fuscobalteata* (Hymenoptera, Apidae) from peninsular Malaysia. *Comp. Biochem. Physiol.* **83B**(3):627-628.

ZUCOLOTO, F.S. (1994). Aspectos gerais da nutrição de insetos, com especial referência em abelhas. In: *Anais Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto* **1**:27-37.

NOTA: As teses indicadas (I), (II), (III) e (IV) encontram-se: (I) Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa; (II) Biblioteca da Universidade de São Paulo; (III) Biblioteca da Universidade Federal do Maranhão e (IV) Biblioteca da Universidade de Barcelona.

APÊNDICE

1. Alimentação artificial para colônias de abelhas do gênero *Melipona*.

a) Internamente às colônias.

Quando a administração de pólen for dentro da colmeia, o pólen pode ser seco ou fermentado. No primeiro caso, a quantidade a ser fornecida deve ser no máximo 3g a cada 10 dias para colônias médias e fortes (Notas acima de 6,0). Mais do que isso, este nutriente acumula dentro da colônia sem que seja devidamente manipulado e consumido pelas operárias. O pólen já fermentado é o mais indicado e pode ser usado o pólen de *Scaptotrigona* sp (mandaguari) ou o pólen de taboa (Camargo, 1976). Foram obtido bons resultados com o pólen de mandaguari fornecido a uma quantidade de 5 a 7g em potes artificiais (AIDAR & CAMPOS, 1994 e AIDAR, 1995) e a intervalos de 25 a 30 dias para colônias de *M. q. anthidioides* médias a fortes. Com relação às colônias fracas, é preciso muito cuidado quando fornece-se pólen fermentado pois o ataque de forídeos é uma constante. Nestes casos, reduzir a quantidade e observar de 2 em 2 dias para ver se não houve postura de forídeos é uma forma de prevenção contra o ataque deste predador.

Preferencialmente, o pólen fornecido às colônias novas deve ser fermentado para uso imediato pelas operárias provisionadoras de células de crias. Assim, a postura da rainha fisogástrica ocorrerá normalmente, sem interrupção e a colônia terá um desenvolvimento ótimo. O excesso de pólen dentro da colônia permite a entrada de forídeos atraídos pelo cheiro que este alimento possui. O pólen de *Scaptotrigona* sp apresenta aroma muito forte e adocicado, o que proporciona maior atração de forídeos. É sempre bom ter algumas colônias desta espécie para servir de fonte de pólen para colônias fracas de *Melipona*.

b) Externamente às colmeias.

Esta forma de fornecimento de pólen só funciona quando o pólen está na forma sólida e bem pulverizado. Para isto, o pólen em bolotas deverá passar por um processo de trituração dos seus grânulos normais, podendo ser utilizado um liquidificador comum com lâminas bem afiadas. O pólen na forma de bolotas as campeiras não conseguem coletar (AIDAR, 1996b).

Mistura-se o pó com canela e açúcar cristal, também por meio de liquidificador para homogeneizar bem os ingredientes. Esta mistura foi denominada de PCA (85 % de pólen, 10% de canela em pó e 5% de açúcar)(AIDAR, 1996b). Essências vegetais naturais, como por exemplo, essência ou pétalas de rosas, podem ser utilizadas para atrair mais rapidamente as campeiras. Quando as pétalas de rosas são vermelhas, obtém-se melhores resultados (AIDAR, c.p.). Com um bom treinamento das abelhas, apenas o PCA fornece bons resultados.

Os meliponíneos, em geral, raramente coletam alimento sólido em alimentadores coletivos, dificultando o aumento da atividade de postura da rainha em épocas de escassez de floradas. Isto impede o aumento da população geneticamente ativa e a estação de floradas fica restrita ao fortalecimento das colônias e não à divisão das mesmas, como é preciso acontecer em regiões onde espécies estão sob o efeito da homozigose dos alelos xo.

Tendo como base estas duas técnicas de alimentação de meliponíneos, alimentação interna e externa em alimentadores coletivos, obteve-se a manutenção das colônias em condições ideais para o desenvolvimento dos experimentos.